

# Charakterisierung von zwei Adipozyten-P2-Rezeptoren im weißen Fettgewebe von Wistar-Ratten

## Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Johannes Schödel  
geboren am 03. Juli 1977 in Marktredwitz

Gutachter

1. Prof. Dr. Klinger, Jena
2. Prof. Dr. Müller, Jena
3. Prof. Dr. Wabitsch, Ulm

Tag der öffentlichen Verteidigung: 16. Dezember 2003

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
1.1 Grundlagen des Glukose- und Triglyzeridstoffwechsels in der Fettzelle .....	4
1.2 Die Einteilung der P1- und P2-Rezeptoren .....	5
1.3 Die Lipogenese in der Fettzelle.....	10
1.4 Zielstellung .....	14
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
2.1 Versuchstiere .....	16
2.2 Reagenzien .....	16
2.3 Lösungen .....	16
2.4 Isolierung der Adipozyten.....	17
2.5 Messung der Lipogenese .....	18
2.6 Messung des Glukosetransports.....	19
2.7 Bestimmung der Triglyzeridkonzentration .....	20
2.8 Dünnschichtchromatographie.....	22
2.9 Statistische Auswertung .....	23
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>24</b>
3.1 Regulation der Lipogenese durch Adeninnukleotide in Adipozyten.....	24
3.1.1 Extrazelluläres Adenosintriphosphat stimuliert die Lipogenese in isolierten Adipozyten.....	24
3.1.1.1 ATP stimuliert den Einbau von Tritium aus D-[3-3H]-Glukose in Triglyzeride .....	24

3.1.1.2	ATP stimuliert in Gegenwart von Adenosindeaminase und CGS15943.....	25
3.1.2	Nur Adenin-Verbindungen stimulieren die Lipogenese.....	27
3.1.3	Synthetische P2-Rezeptor-Agonisten: $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP als P2-Agonist mit stimulierender Wirkung, $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und 2-MeS-ATP als P2-Agonisten mit hemmender Wirkung auf die Lipogenese.....	28
3.1.4	$\alpha,\beta$ -Methylen-ATP zeigt keine komplette Hemmung der Wirkung stimulierender Agonisten .....	29
3.1.5	Die Wirkung von P2-Rezeptor Antagonisten .....	30
3.1.5.1	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure erhöht die stimulierende Wirkung von ATP und hemmt die Wirkungen von $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP.....	31
3.1.5.2	Suramin und Reactive Blue 2 beeinflussen die Nukleotideffekte auf die Lipogenese nicht.....	32
3.2	Die Lipogenese und ihre Beeinflussung durch Nukleotide sind abhängig von Alter, Geschlecht und Fettdepot.....	32
3.2.1	Unterschiede in der basalen Lipogeneseaktivität der untersuchten Gruppen.....	33
3.2.2	Die Wirkungen der Nukleotide auf Adipozyten von männlichen Tieren ..	33
3.2.3	Die Wirkungen der Nukleotide auf Adipozyten von weiblichen Tieren ....	33
3.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Wirkung extrazellulärer Nukleotide auf die basale Lipogenese in Adipozyten.....	34
3.3	Die Wirkungen extrazellulärer Nukleotide auf die Lipogenese in insulinstimulierten Adipozyten in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Fettdepot .....	36
3.3.1	Die Wirkung von Insulin auf die basale Lipogenese in Adipozyten von Ratten verschiedenen Alters und Geschlechts .....	36
3.3.2	Die Wirkungen der Nukleotide auf die Lipogenese in insulinstimulierten Adipozyten von männlichen Ratten .....	36
3.3.3	Die Wirkungen der Nukleotide auf die Lipogenese in insulinstimulierten Adipozyten von weiblichen Tieren .....	37

3.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Wirkung extrazellulärer Nukleotide auf die Lipogenese in insulinstimulierten Zellen.....	39
3.4	ATP, $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP zeigen keine Wirkung auf den basalen und den insulinstimulierten Glukosetransport .....	39
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>41</b>
4.1	Zwei Tests sind zur Messung der Lipogenese in frisch isolierten Adipozyten von Wistar-Ratten geeignet.....	42
4.2	Der Effekt des ATP ist nicht über P1-Rezeptoren, sondern über einen Adipozyten-P2-Rezeptor vermittelt.....	42
4.3	Drei Arbeiten beschreiben ein ähnliches Ligandenprofil .....	43
4.4	Es existieren mindestens zwei Adipozyten-P2-Rezeptoren .....	44
4.5	Die Wirkung von Antagonisten an den Adipozyten-P2-Rezeptoren .....	45
4.6	Versuch einer Zuordnung der Adipozyten-P2-Rezeptoren anhand ihrer pharmakologischen Profile gegenüber bekannten P2-Rezeptoren .....	47
4.6.1	Der lipogenesehemmende Adipozyten-P2-Rezeptor .....	47
4.6.2	Der lipogenesestimulierende Adipozyten-P2-Rezeptor .....	48
4.6.3	Die Wirkungen der extrazellulären Nukleotide müssen über die Aktivierung mindestens eines P2Y-Rezeptors vermittelt werden.....	48
4.7	Die Wirkungen der extrazellulären Nukleotide über die Adipozyten-P2-Rezeptoren sind bei beiden Geschlechtern alters- und depotabhängig nachweisbar .....	50
4.8	Adipozyten-P2-Rezeptoren nehmen nicht an der Regulation des Glukosetransports in die Fettzelle teil .....	51
4.9	Vergleich der Wirkungsweise des Adipozyten-P2-Rezeptorsystems mit der des Adrenorezeptorsystems auf die Lipogenese im Fettgewebe .....	53
4.10	Die Adipozyten-P2-Rezeptoren als Ursache von Krankheiten des Fettgewebes.....	53

Inhaltsverzeichnis	IV
<b>5 SCHLUSSFOLGERUNGEN</b>	<b>55</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>56</b>
<b>7 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN</b>	<b>66</b>
<b>8 ANHANG</b>	<b>68</b>

## Zusammenfassung

P2-Rezeptoren sind an der Regulation vielfältiger Prozesse im Organismus beteiligt. In fast allen Geweben des Menschen und der Nagetiere konnte man sie nachweisen. Sie werden in P2X-Rezeptoren als ligandengesteuerte Ionenkanäle und P2Y-Rezeptoren als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren unterteilt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung von P2-Rezeptoren im weißen Fettgewebe von Wistar-Ratten. Dabei wurden die Wirkungen von extrazellulären Nukleotiden auf zwei wesentliche Stoffwechselwege im Fettgewebe untersucht: den Glukosetransport in die Adipozyten und die de novo Lipogenese aus Glukose.

Grundlage der Messung des Glukosetransports war die Messung der Aufnahme von 2-Deoxy-2-6-[ $^3\text{H}$ ]-D-Glukose in frisch isolierte Adipozyten. Diese Substanz wird in den Fettzellen phosphoryliert, aber nicht weiter metabolisiert. Die Inkorporation von tritiummarkierter 3-[ $^3\text{H}$ ]-D-Glukose in toluollösliche Verbindungen, überwiegend in Triglyzeride, stellt das Prinzip für die Bestimmung der Lipogenese dar. Der Einbau in Triglyzeride wurde durch die Dünnschichtchromatographie der lipophilen Verbindungen verifiziert. Alle experimentellen Ansätze wurden im Labor neu etabliert und für die Messung von Nukleotidwirkungen modifiziert.

Die Untersuchungen zeigen, dass natürliche und synthetische extrazelluläre Nukleotide über P2-Rezeptoren Einfluss auf die Lipogenese in frisch isolierten Adipozyten von Wistar-Ratten nehmen. Die natürlichen Adennukleotide AMP, ADP und ATP stimulieren in der Konzentration 50  $\mu\text{M}$  die Lipogenese signifikant. Weitere natürliche Nukleotide, wie CTP, GTP, UDP, UTP, ITP und  $\text{A}_2\text{P}_4$  haben keinen Effekt auf die Lipogenese. Durch den Einsatz von Adenosindeaminase bzw. CGS15943, einem Adenosinrezeptorantagonisten, kann die Stimulierung der Lipogenese über P1-Rezeptoren ausgeschlossen werden.

Die Verwendung der synthetischen Nukleotide  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP,  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP, 2-MeS-ATP und  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  erlaubt eine weitere Charakterisierung des Adipozyten-P2-Rezeptorsystems.  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP stimuliert die Lipogenese ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ .  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und 2-MeS-ATP hemmen die Lipogenese signifikant.  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  hat keine Wirkung. Die stimulierenden Agonisten ATP und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP wirken ebenfalls in Gegenwart von  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP, das als desensibilisierender

Agonist an P2-Rezeptoren bekannt ist. Dies und die hemmende Wirkung von 2-MeS-ATP weisen auf die Anwesenheit von mindestens zwei P2-Rezeptoren in Adipozyten hin. Beide Rezeptoren sind durch den P2-Rezeptorantagonisten PPADS hemmbar. Weitere Antagonisten, Suramin und Reactive Blue 2, haben keinen hemmenden Effekt auf die Nukleotidwirkungen.

Die beschriebenen Effekte der extrazellulären Nukleotide lassen sich in Adipozyten aus dem gonadalen und perirenal Fettdepot von Ratten unterschiedlichen Alters und Geschlechts nachweisen. Weiterhin zeigen die synthetischen Nukleotide  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP ihre differierenden Wirkungen auch deutlich in Anwesenheit von Insulin, das den Glukosetransport in die Zelle stimuliert und lipogenetische Enzyme induziert bzw. aktiviert. Ein Großteil der stimulierenden Wirkung des Insulins wird über die Steigerung des Glukosetransports verursacht. Die Nukleotide (ATP,  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP) ihrerseits beeinflussen die Aufnahme von Glukose nicht. Sie müssen demnach ihre Wirkung direkt auf Enzyme, die an der Lipogenese beteiligt sind (z.B. Acetyl-CoA-Carboxylase, Pyruvatdehydrogenase, Fettsäuresynthase), ausüben.

In dieser Arbeit wurden zwei Adipozyten-P2-Rezeptoren des weißen Fettgewebes pharmakologisch charakterisiert. Das Profil des lipogenesestimulierenden Adipozyten-P2-Rezeptors ( $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP > ATP > AMP > ADP) ist ähnlich dem, das in Studien über die Stimulierung der Aromatase in Präadipozyten beschrieben wurde. Davon abzugrenzen und für weißes Fettgewebe neuartig ist das Agonistenprofil (2-MeS-ATP  $\geq$   $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP > ATP) des lipogenesehemmenden Adipozyten-P2-Rezeptors. Eine Zuordnung der Rezeptoren aufgrund der Agonisten- und Antagonistenwirkung zu den Profilen bekannter P2-Rezeptoren ist nicht eindeutig möglich. Molekularbiologisch ist bisher nur der P2X<sub>1</sub>-Rezeptor im weißen Fettgewebe nachgewiesen.

Das beschriebene System mit entgegengesetzten Wirkungen auf die Lipogenese ist analog dem der Adrenorezeptoren  $\alpha_2$  und  $\beta$  im weißen Fettgewebe, die je nach Ausprägung die Lipogenese stimulieren oder hemmen. Der Ausfall eines P2-Rezeptors, z.B. durch eine Mutation im Gen des Adipozyten-P2-Rezeptors, oder die altersabhängige Änderung der Aktivität, könnten für die Unterschiede der individuellen körperlichen Konstitution oder die Entwicklung der Insulinresistenz im Fettgewebe ursächlich sein. Die weitere Forschung sollte den molekularbiologischen Nachweis der



Rezeptoren, die Aufklärung der beteiligten Signaltransduktionswege und die Untersuchung humanen Fettgewebes auf die Existenz von Adipozyten-P2-Rezeptoren zum Ziel haben.

## 1 Einleitung

### 1.1 Grundlagen des Glukose- und Triglyzeridstoffwechsels in der Fettzelle

Das Metabolische Syndrom wird durch vier pathologische Erscheinungen im Organismus des Menschen charakterisiert: Hypertonie, Dyslipidämie, Hyperinsulinämie und Adipositas. Es ist noch nicht geklärt, welche dieser pathologischen Zustände dem Metabolischen Syndrom und der peripheren Insulinresistenz als primäre Ursache zugrunde liegt. Fest steht, dass sie wichtigste Risikofaktoren für Volkskrankheiten, wie Diabetes mellitus Typ II oder Atherosklerose sind (KAHN und FLIER, 2000; STEARS und BYRNE, 2001).

Folge des Metabolischen Syndroms sind u.a. Fehlfunktionen im Pankreas und den insulin sensitiven Geweben, wie der gestreiften Muskulatur, der Leber und dem Fettgewebe.

Häufigste Ursache der Adipositas ist die übermäßige Aufnahme von fettreicher Nahrung in der industrialisierten Welt. Überschüssige Fettsäuren werden über den Blutkreislauf in das Fettgewebe transportiert und dort als Triglyzeride gespeichert.

Die Leber und das Fettgewebe sind aber ebenfalls in der Lage, bei kohlenhydratreicher Diät, diese in Fettsäuren umzuwandeln, die dann für die Speicherung zur Verfügung stehen. Diesen Stoffwechselweg nennt man Lipogenese (HELLERSTEIN, 1999).

Insulin ist das wichtigste Hormon, das anabol in die Synthese eingreift. Es stimuliert die Aufnahme der Glukose aus dem Blutkreislauf in die Fettzelle und induziert dort die Bildung von glykolytischen und lipogenetischen Enzymen (SALTIEL und KAHN, 2001). Die gespeicherte Energie des Fettgewebes kann im Hungerzustand oder bei körperlicher Anstrengung durch Freisetzung von Katecholaminen wieder verfügbar gemacht werden. Noradrenalin und Adrenalin aktivieren über die  $\beta$ -Adrenorezeptoren die Lipolyse und die Wiederfreisetzung von Fettsäuren in den Blutkreislauf (LAFONTAN und BERLAN, 1993).

1994 konnte mit der Entdeckung des Leptins, das dem Organismus direkt den Füllungszustand seiner Triglyzeridspeicher mitteilt, ein neuer Baustein in das Signalsystem des Fettgewebes eingefügt werden. Bei Menschen und im Tiermodell ist

ein defektes Leptinsignalsystem für einen adipösen Phänotyp verantwortlich (ZHANG et al., 1994). Die Mechanismen der zahlreichen autokrinen, parakrinen und endokrinen Transmitter und Hormone, die weiterhin an der Regulation des Kohlenhydrat- und Triglyzeridmetabolismus in der Fettzelle beteiligt sind, sind noch nicht alle im Detail verstanden (FRÜHBECK et al., 2001).

Die regulatorische Rolle des extrazellulären Adenosins mit Wirkung über den P1-Rezeptor auf Lipolyse (Hemmung) und Lipogenese (Stimulierung) wurde dagegen bereits weitgehend aufgeklärt (JOOST und STEINFELDER, 1982; VASSAUX et al., 1993). Abzugrenzen davon sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die sich mit der Wirkung von extrazellulären Nukleotiden auf den Glukosetransport und die Lipogenese in Adipozyten über P2-Rezeptoren befasst.

## 1.2 Die Einteilung der P1- und P2-Rezeptoren

1929 konnten Drury und Szent-Györgyi nachweisen, dass Adenosin und Adenosinmonophosphat zahlreiche Effekte auf Organe des Blutkreislaufes und des Magen-Darm-Traktes von Nagetieren haben (DRURY und SZENT-GYÖRGYI, 1929). Sie beschrieben nach intravenöser Gabe von Adenosin oder einem Rohextrakt aus dem Herzmuskel Herzblockade, Dilatation von Arterien, Blutdrucksenkung und Inhibition der intestinalen Muskelkontraktion als Folge der Einwirkung extrazellulärer Purinverbindungen.

Die Beschreibung der selektiven Hemmbarkeit der durch Adenosin intrazellulär gesteigerten 3',5'-cyclo-AMP-Konzentration durch Methylxanthine im Gehirn (SATTIN und RALL, 1970), führte 1978 zur Konstruktion des Modells zweier verschiedener Oberflächenrezeptoren: für Adenosin  $\geq$  Adenosinmonophosphat (AMP)  $>$  Adenosindiphosphat (ADP)  $\geq$  Adenosintriphosphat (ATP) als natürliche Liganden mit sinkender Affinität auf der einen und für ATP  $\geq$  ADP  $>$  AMP  $\geq$  Adenosin (Abb. 1.1) auf der anderen Seite (BURNSTOCK, 1978). Burnstock formulierte in diesem Zusammenhang ebenfalls die These einer purinergen Kotransmission. Er schlägt gleiche Speicherorte und simultane Freisetzung, aber unterschiedliche Bindungsstellen auf den Zielzellen für Transmitter (z.B. Noradrenalin und ATP) im autonomen Nervensystem vor (BURNSTOCK, 1976; BURNSTOCK, 1990). Die These der Exozytose als Freisetzungs-

mechanismus für Nukleotide im peripheren und zentralen Nervensystem ist jetzt weitgehend anerkannt. Darüber hinaus könnte eine durch Transportproteine vermittelte Freisetzung erfolgen (BODIN und BURNSTOCK, 2001).

Burnstock unterteilte die Bindungsstellen für extrazelluläre Nukleotide in P1-Rezeptoren, an denen Adenosin eine hohe Affinität aufweist, und P2-Rezeptoren, an denen ATP und ADP eine höhere Affinität haben.

In den letzten zwanzig Jahren wurden Rezeptoren für extrazelluläres Adenosin und extrazelluläre Nukleotide mit einer Vielzahl von Wirkungen auf Zellfunktionen in den meisten Organsystemen der Säugetiere nachgewiesen (BRAKE und JULIUS, 1996; WINDSCHEIF, 1996; BOARDER und HOURANI, 1998; RALEVIC und BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK und WILLIAMS, 2000).

Bis jetzt sind vier P1-Rezeptor-Subtypen bekannt:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$  (RALEVIC und BURNSTOCK, 1998; FREDHOLM et al., 2000). P1-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. In Adipozyten wurde der  $A_1$  Rezeptor nachgewiesen, der dort die Adenylatzyklaseaktivität hemmt und damit zu einer Erniedrigung der cAMP-Konzentration in der Zelle führt (TATSIS-KOTSIDIS und ERLANGER, 1999). Dieser Effekt hat die Inhibierung der Lipolyse und die Steigerung der Insulinsensitivität in der Fettzelle zur Folge (JOOST und STEINFELDER, 1982).

Die heutige Einteilung der P2-Rezeptoren, die neben den Adeninnukleotiden selektiv auch Uracilnukleotide als Agonisten binden, erfolgt hauptsächlich nach der molekularen Struktur der Rezeptoren. Die aktivierten Signaltransduktionswege und das pharmakologische Profil werden als weitere Kriterien benutzt. Demnach existieren zwei P2-Rezeptorfamilien: P2X-Rezeptoren als ligandengesteuerte Ionenkanäle und P2Y-Rezeptoren als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (ABBACCHIO und BURNSTOCK, 1994; FREDHOLM et al., 1994; RALEVIC und BURNSTOCK, 1998; KHAKH et al., 2001).

Bis heute sind sieben P2X-Rezeptoren aus Säugetieren kloniert worden ( $P2X_1$ - $P2X_7$ ), wobei ein Rezeptor aus drei homologen Untereinheiten gebildet wird (BRAKE et al., 1994; VALERA et al., 1994). Es wurde auch das Vorkommen heteromerer P2X-

Rezeptoren ( $P2X_1P2X_3$ ) mit veränderten pharmakologischen Profilen bereits beschrieben (EVANS et al., 1995; NICKE et al. 1998; NORTH und SURPRENANT, 2000). Neben den natürlichen Purinnukleotiden ATP und ADP werden Adeninpolyphosphate (an  $P2X_1$  und  $P2X_3$ ) und synthetische Agonisten (Abb. 1.1), wie  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP (an  $P2X_1$ ,  $P2X_3$  und  $P2X_1P2X_3$ , schwach an den übrigen  $P2X$ -Rezeptoren) und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP (am  $P2X_1$ -Rezeptor), als  $P2X$ -selektive Agonisten beschrieben (Tabelle 1.1; LAMBRECHT, 2000). Alle  $P2X$ -Rezeptoren werden durch 2-MeS-ATP (2-Methylthio-ATP) aktiviert (NORTH und SURPRENANT, 2000).  $ATP_{\gamma}S$  ist Agonist an den Rezeptoren  $P2X_2$  bzw.  $P2X_4$  (RALEVIC und BURNSTOCK, 1998). Diese Affinitätsuntersuchungen wurden meist an klonierten Rezeptoren in definierten Systemen durchgeführt. Mitglieder der  $P2X$ -Rezeptorfamilie sind in viele biologische Prozesse involviert. Sie beeinflussen die Muskelkontraktion, das kardiovaskuläre und das respiratorische System, das Immunsystem und den Zelltod. Sie modulieren die Transmitterfreisetzung, die neuronale Erregbarkeit und nehmen an der Generierung und Transmission nozizeptiver Signale teil (RALEVIC und BURNSTOCK, 1998; CHIZH und ILLES, 2000; LAMBRECHT, 2000).

$P2Y_1$ ,  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$ ,  $P2Y_{11}$  und  $P2Y_{12}$  sind als Vertreter der G-Protein-gekoppelten Nukleotidrezeptoren nachgewiesen worden (RALEVIC und BURNSTOCK, 1998; NICHOLAS, 2001). Ihre Tertiärstruktur besteht aus einem Protein mit sieben Transmembrandomänen, das an ein G-Protein gekoppelt ist (PIERCE et al., 2002). Die Signalübertragungswege umfassen die Aktivierung der Phospholipase C, der Proteinkinase C, sowie die Aktivierung oder Inaktivierung der Adenylatcyclase (VON KÜGELGEN und WETTER, 2000). ATP und ADP, sowie UTP und UDP werden als natürliche Agonisten an  $P2Y$ -Rezeptoren beschrieben. 2-MeS-ADP ist ein synthetischer Agonist für die  $P2Y$ -Rezeptoren  $P2Y_1$ ,  $P2Y_{11}$  und  $P2Y_{12}$ , 2-MeS-ATP für alle  $P2Y$ -Rezeptoren (Tabelle 1.1; VON KÜGELGEN und WETTER, 2000; BARNARD und SIMON, 2001).

Wie  $P2X$ -Rezeptoren sind  $P2Y$ -Rezeptoren in nahezu allen Zellen des menschlichen Organismus vorhanden.  $P2Y$ -Rezeptoren modulieren die neuronale Signalübertragung, induzieren die Freisetzung von NO aus dem Endothel und kontrollieren Chloridströme im Lungenepithel. Weiterhin sind sie in der Plazenta, dem Herzen, den

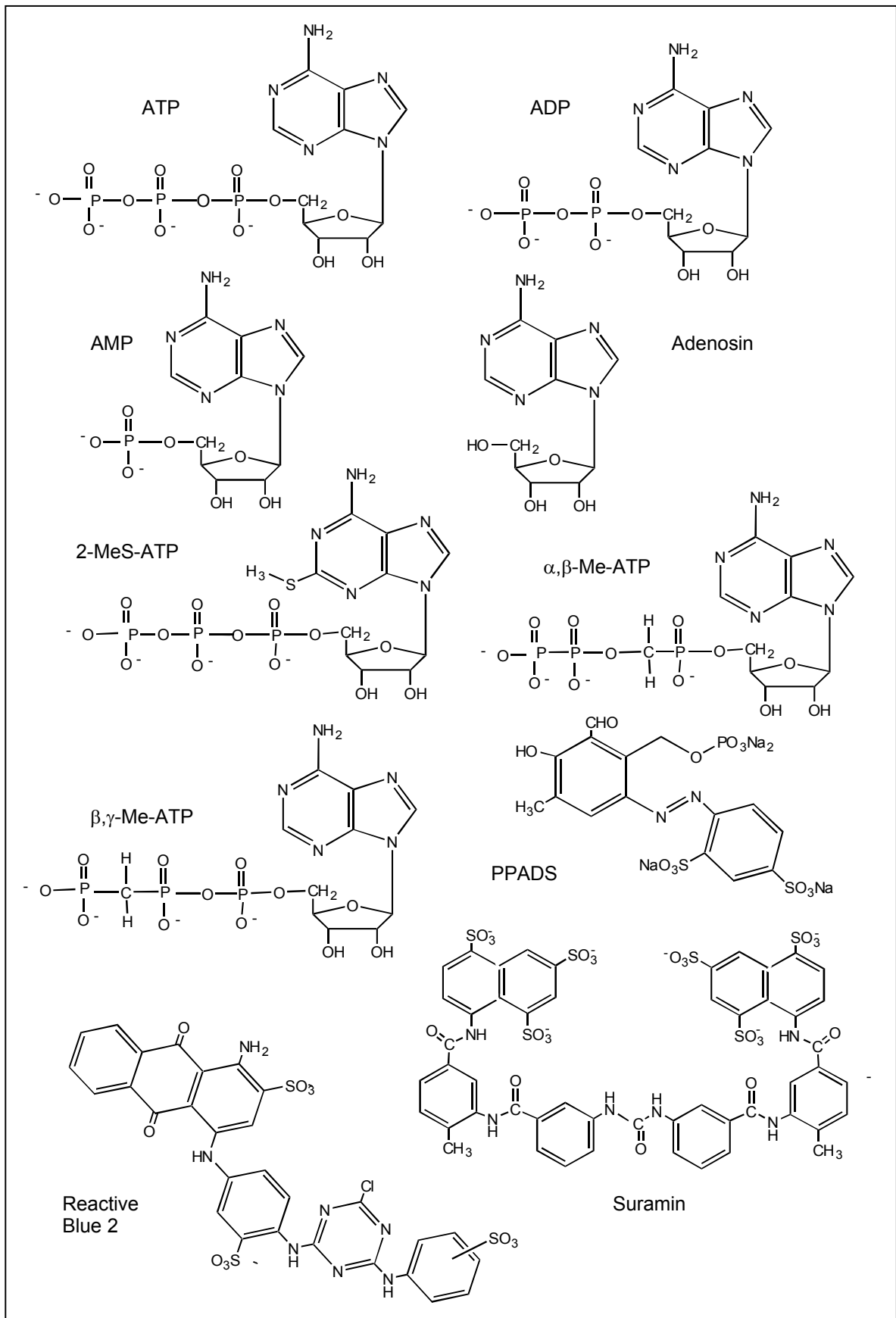


Abb. 1.1 Strukturformeln der natürlichen und synthetischen P2-Rezeptor-Agonisten und der P2-Rezeptor-Antagonisten PPADS (Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure), Reactive Blue 2 und Suramin

Blutgefäßen, dem Gehirn, dem Gastrointestinaltrakt, der Milz und den Nieren nachgewiesen worden. Eine wichtige und mit dem Aggregationshemmer Clopidogrel therapeutisch genutzte Rolle spielen der P2Y<sub>1</sub>- und der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor in der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation (HOLLOPETER et al., 2001; NICHOLAS, 2001; HACKE, 2002).

An beiden Rezeptorklassen müssen ATP, ADP, ATP- $\gamma$ -S sowie 2-MeS-ATP als nichtselektive Agonisten gesehen werden.

Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure (PPADS), Suramin und Reactive Blue 2 (Abb. 1.1) dienen als nichtselektive Antagonisten an P2X- und P2Y-Rezeptoren (Tabelle 1.1; LAMBRECHT et al., 1992; ZIGANSHIN et al., 1993; CHARLTON et al., 1996). Die Interpretation der Ergebnisse aus Studien mit Antagonisten gestaltet sich in manchen Fällen schwierig. Z.B. wurde für Suramin und seine Derivate unabhängig von der Antagonistenwirkung die Aktivierung von mehreren Signalmechanismen in den Zielzellen beobachtet (RALEVIC und BURNSTOCK, 1998).

Rezeptor	Agonisten	Antagonisten
P2X <sub>1</sub>	ATP= $\alpha$ , $\beta$ -Me-ATP=2-MeSATP> $\beta$ , $\gamma$ -Me-ATP>ADP	PPADS, Suramin
P2X <sub>2</sub>	MeSATP>ATP> $\alpha$ , $\beta$ -Me-ATP, ADP	PPADS, Suramin, RB2
P2X <sub>3</sub>	ATP= $\alpha$ , $\beta$ -Me-ATP=2-MeSATP>ADP	PPADS, Suramin
P2X <sub>4</sub>	ATP $\geq$ 2-MeSATP>ADP	
P2X <sub>5</sub>	ATP $\geq$ 2-MeSATP>ADP	PPADS, Suramin
P2X <sub>6</sub>	ATP>2-MeS-ATP>ADP	
P2X <sub>7</sub>	MeSATP>ATP	
P2Y <sub>1</sub>	2-MeSADP=2-MeSATP>ADP>ATP	PPADS, Suramin, RB2
P2Y <sub>2</sub>	UTP=ATP	Suramin
P2Y <sub>4</sub>	UTP=ATP=ITP=A2P4	PPADS, RB2
P2Y <sub>6</sub>	UDP>UTP>ADP>2-MeSATP	PPADS, Suramin, RB2
P2Y <sub>11</sub>	ATP $\gamma$ S>ATP>2-MeSATP	Suramin, RB2
P2Y <sub>12</sub>	2-MeSADP=2-MeSATP>ADP>ATP	

Tabelle 1.1 Agonisten und Antagonisten an den bekannten P2-Rezeptoren. Nach RALEVIC und BURNSTOCK, 1998; NORTH und SURPRENANT, 2000; VON KÜGELGEN und WETTER, 2000.

Eine genaue pharmakologische Charakterisierung von Rezeptoren in Geweben wird durch die Existenz von mehreren Einflussfaktoren erschwert: die simultane Expression von unterschiedlichen P2-Rezeptoren in einer Zelle mit sich überschneidenden Ligandenprofilen, die Aktivität von 3',5'-Ektonukleotidasen, die die Konzentration von nichtstabilen Agonisten reduzieren können (ZIMMERMANN, 2000), und eine mögliche Freisetzung von Nukleotiden aus den zu untersuchenden Zellen selbst.

Bisher sind außer den Arbeiten in unserem Labor noch keine anderen Untersuchungen zu P2-Rezeptoren in reifen Adipozyten aus dem weißen Fettgewebe bekannt. Schmidt konnte den Einfluss von extrazellulären Nukleotiden auf die Aktivität der Aromatase und die Freisetzung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  in Präadipozyten aus dem humanen Fettgewebe nachweisen (SCHMIDT und LÖFFLER, 1998). Weiterhin sind P2-Rezeptoren in Adipozyten aus braunem Fettgewebe untersucht worden (PAPPONE und LEE, 1996; LEE und PAPPONE, 1997a; OMATSU-KANBE und MATSUURA, 1999; WILSON und PAPPONE, 1999; WILSON et al., 1999; WILSON et al., 2000). Braunes Fettgewebe ist ebenfalls in der Lage, Energie in Form von Triglyzeriden zu speichern. Seine Aufgabe ist jedoch, diese Energie in Wärme umzuwandeln. Hieraus resultiert seine Bedeutung in der Temperaturregulierung der Säugetiere. Die bisherigen Arbeiten konzentrierten sich dabei auf elektrophysiologische und thermogenetische Effekte der P2-Rezeptor-Stimulierung in braunen Adipozyten.

### **1.3 Die Lipogenese in der Fettzelle**

Die Hauptaufgabe des weißen Fettgewebes ist die Speicherung und die Freisetzung von Triglyzeriden. Es dient dem Körper damit als Energiedepot, das dem Organismus in Zeiten der Nahrungskarenz Fettsäurereserven zur Energiegewinnung bereitstellt. Die Aufnahme von Fettsäuren aus dem Blutkreislauf, die entweder aus der Nahrung stammen oder in der Leber synthetisiert werden, und die anschließende Veresterung zu Triglyzeriden stellt eine Möglichkeit der Energiespeicherung dar. Die Fettzelle ist aber auch selbst in der Lage, Fettsäuren de novo aus Kohlenhydraten zu synthetisieren.



Die de novo Lipogenese in humanen Adipozyten spielt bei normaler Ernährung eine geringere Rolle als die in Hepatozyten. Unter bestimmten Bedingungen wird der Synthese von Fettsäuren im menschlichen Fettgewebe dagegen ein größerer Wert beigemessen (SWIERCZYNSKI et al., 2000).

Vor allem die de novo Lipogenese aus Glukose in Adipozyten der Nagetiere ist ein wichtiger Stoffwechselweg zur Synthese von Fettsäuren und Triglyzeriden (VERNON et al., 1999). Hierbei erfolgt der Transport der Glukose aus dem Blut in die Fettzelle durch den Glukosetransporter Glut 4 insulinabhängig (SUMMERS et al., 1999; SUMMERS et al., 2000; LANGE, 2001). Der intrazelluläre Metabolismus der Glukose in der Fettzelle im Rahmen der Glykolyse führt zu der Gewinnung des Energieäquivalents NADPH/H<sup>+</sup> über den Hexosemonophosphatweg, der Bereitstellung von  $\alpha$ -Glyzerophosphat für die Triacylglyzeridsynthese und der Erzeugung von Acetyl-Co-A für die Fettsäuresynthese (Abb. 1.2).

Die Lipogenese in den Fettzellen unterliegt einer vielschichtigen hormonellen Regulation.

Insulin stimuliert die Lipogenese über die Aktivierung des Insulinrezeptors. Die Zunahme der Thyrosinkinaseaktivität bewirkt über ein komplexes intrazelluläres Signaltransduktionssystem die Rekrutierung neuer Glukosetransporter und die Anschaltung sowohl glykolytischer als auch lipogenetischer Enzyme. Die intrazellulären Effekte des Insulinsignals beinhalten weiterhin die Steigerung der Expression lipogenetischer Enzyme über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (KERSTEN et al., 2000; KERSTEN, 2001).

Von der Regulation sind vor allem die Pyruvatdehydrogenase (JITRAPAKDEE und WALLACE, 1999), die Acetyl-CoA-Carboxylase und die Fettsäuresynthase (GIRARD et al., 1994) betroffen.

Diese Enzyme werden auch durch entstehende Metabolite in ihrer Aktivität beeinflusst. Langkettige Fettsäuren hemmen die Acetyl-CoA-Carboxylase. Im Zustand der Lipolyse wird damit die sinnvolle Hemmung der Lipogenese erreicht und eine weitere Zunahme des Fettsäurepools verhindert. Sind ein Überschuss an Glukose und das Insulinsignal vorhanden, so wird die Acetyl-CoA-Carboxylase aktiviert, und die Fettzelle vermag Fettsäuren zu bilden.

Die Pyruvatdehydrogenase wird direkt durch die Wirkung des Insulins aktiviert und durch einen Überschuss an Acetyl-CoA bzw. NADH/H<sup>+</sup> gehemmt.

Die Regulation der Fettsäuresynthese erfolgt hauptsächlich auf der Ebene der Expression, wobei Insulin in Gegenwart von Glukose als Induktor wirkt und ungesättigte Fettsäuren als Repressoren.

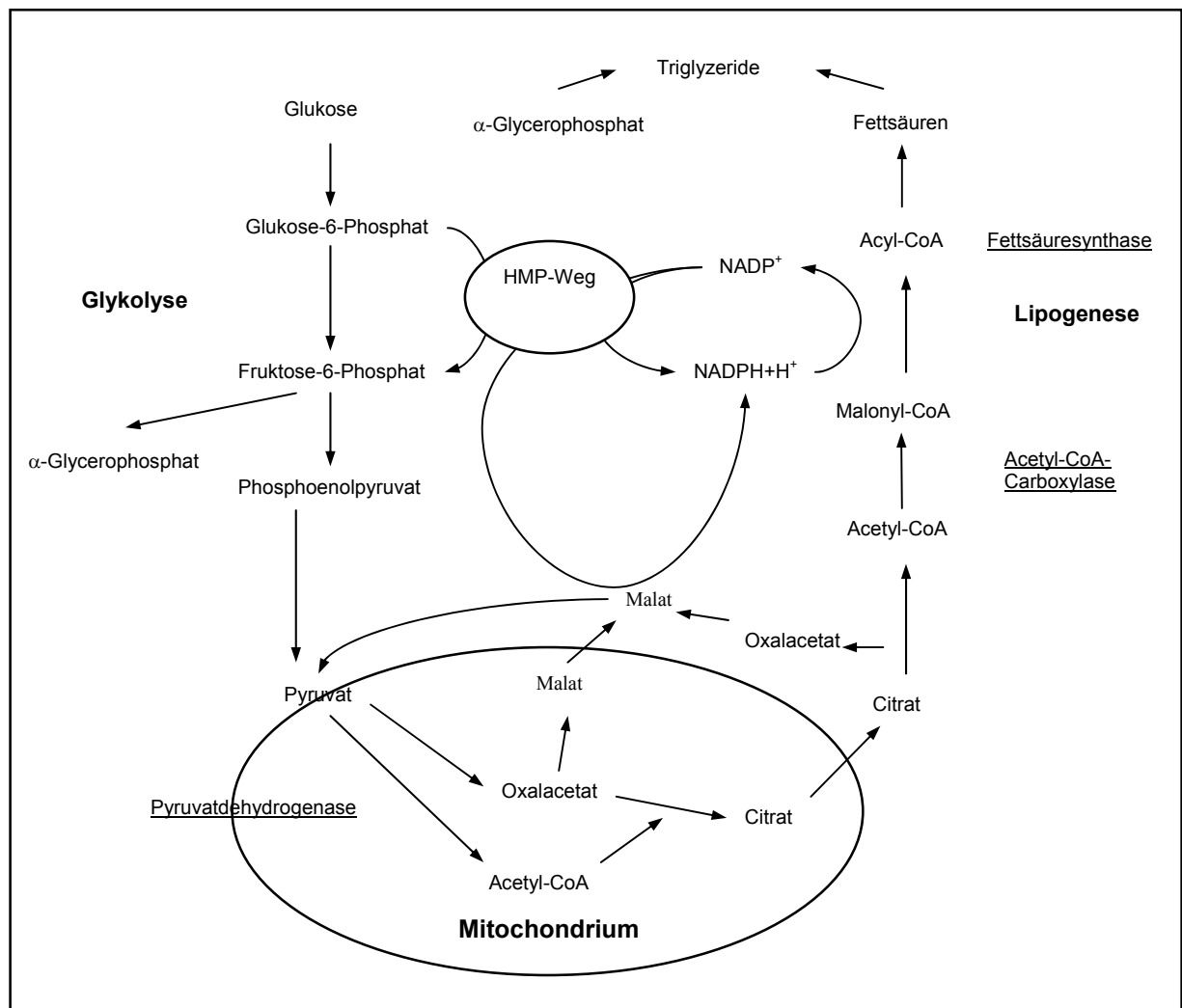


Abb. 1.2: Beziehung des Glukosestoffwechsels zur Lipogenese in der Fettzelle (vereinfachtes Schema nach LÖFFLER und PETRIDES, 1998; JITRAKDEE und WALLACE, 1999); HMP-Weg: Hexosemonophosphat-Weg

Das Nukleosid Adenosin wirkt über P1-Rezeptoren durch die Hemmung der cAMP-Produktion stimulierend auf Glukosetransport und Lipogenese, sowie hemmend auf die Lipolyse (JOOST und STEINFELDER, 1982; VASSAUX et al., 1993).

Glukokortikoide bewirken über den Glukokortikoidrezeptor eine Induktion der Lipoproteinlipaseaktivität in Zellmembran der Adipozyten und führen so zur Triglyzeridspeicherung in der Fettzelle.

Wichtigste, die Lipogenese hemmende Neurotransmitter sind die Katecholamine, die über Adrenorezeptoren Einfluß auf den Triglyzeridstoffwechsel des Fettgewebes nehmen (LAFONTAN und BERLAN, 1993). Die Hemmung der Lipogenese erfolgt über die cAMP-abhängige Proteinkinase A, die ein von den Katecholaminen und von Glukagon reguliertes Enzym darstellt und ihrerseits durch Phosphorylierung einen Aktivitätsverlust der Acetyl-CoA-Carboxylase herbeiführt (HAYSTEAD et al., 1990). Es wird angenommen, dass die unterschiedliche Körperfettverteilung zwischen Männern und Frauen durch die Distribution verschiedener Adrenorezeptoren im jeweiligen Fettgewebe zustande kommt. So erklärt man sich die gynoide Fettverteilung durch einen erhöhten Anteil an lipolysehemmenden  $\alpha_2$ -Rezeptoren in den entsprechenden Depots.

Für den Energiehaushalt spielt die Aktivierung des sympathischen Nervensystems eine sehr wichtige Rolle, weil sie die Bereitstellung der gespeicherten Energie durch Stimulierung der Lipolyse garantiert (VAN BAAK, 2001).

Eine Vielzahl weiterer Signalmoleküle reguliert den Energiemetabolismus in der Fettzelle. So sind neben der erwähnten endokrinen Regulation auch parakrine und autokrine Signalprozesse im Fettgewebe verantwortlich dafür, dass der Körper eine - der jeweiligen Situation angepasste - Energiebilanz aufweist. Die Bedeutung des Leptins wurde bereits erwähnt. Weiterhin exprimieren und synthetisieren weiße Adipozyten Signalmoleküle wie CETP (cholesterol ester transfer protein), RBP (retinal binding protein), ASP (acylating stimulating protein), PAI-1(plasminogen activator inhibitor 1)  $\text{TNF}\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ), IL-6 (Interleukin 6), Angiotensinogen, Östrogene u.a. (CIANFLONE, 1997; FRÜHBECK et al., 2001; STEARS und BYRNE, 2001). Diese Transmitter und Hormone wirken auto- und parakrin im Fettgewebe. Sie zeigen aber auch endokrine Wirkungen auf den gesamten Organismus.

Genetisch bedingte Veränderungen der Signalmechanismen, die auf metabolische Leistungen der Adipozyten wirken, sind bereits in einigen Hormonsystemen des Fettgewebes entdeckt worden. Neben den Störungen im Leptinsystem sind Veränderungen der Adenosinrezeptorfunktion oder der Adenosinsensitivität der Fettzellen in Koexistenz mit einem adipösen Phänotyp beim Menschen beschrieben worden (KAARTINEN et al., 1991; LANOUE und MARTIN, 1994).

Zusammen mit Noradrenalin könnten extrazelluläre Nukleotide als Co-Transmitter ein Signalsystem des sympathischen Nervensystems im Fettgewebe bilden. Störungen in diesem System würden zu Veränderungen insbesondere im Energiehaushalt des Organismus führen. Die überaus komplexe Regulation der Lipogenese lässt bis jetzt nur einen begrenzten Einblick in die Pathogenese der Krankheiten, die mit einem Ungleichgewicht des Glukose- und Triglyzeridmetabolismus im Fettgewebe einhergehen, zu. Die klinischen Folgen des Metabolischen Syndroms und der Insulinresistenz sind vor allem in den Industrienationen sichtbar. Seit Jahren konzentrieren sich Forschungsbemühungen darauf, weitere biochemische und molekularbiologische Grundlagen dieser Volkskrankheiten zu ergründen. Der Einfluss extrazellulärer Nukleotide über P2-Rezeptoren auf den Glukosemetabolismus der Fettzelle bei Ratten soll in dieser Arbeit untersucht werden.

#### **1.4 Zielstellung**

Grundlage dieser Arbeit ist die Hypothese, dass in reifen Adipozyten ein Rezeptor- und Signalsystem für extrazelluläre Nukleotide existiert. Darauf weist bereits die Beteiligung eines P2-Rezeptors an der Induktion der Aromatase in Präadipozyten aus dem humanen Fettgewebe hin.

In dieser Arbeit sollen Wirkungen extrazellulärer Nukleotide über P2-Rezeptoren auf wichtige Stoffwechselvorgänge in frisch isolierten Adipozyten untersucht werden. Bei Nagetieren ist die de novo Lipogenese aus Glukose der wichtigste Stoffwechselweg, Energie im Körper zu speichern. Ein großer Teil der Lipogenese findet dabei im Fettgewebe statt.

Folgende Fragen sollen in dieser Arbeit bearbeitet werden:

1. Gibt es aussagekräftige Tests, mit denen die Wirkungen extrazellulärer Nukleotide auf den Glukosemetabolismus in Fettzellen gemessen werden können?
2. Beeinflussen extrazelluläre Nukleotide über P2-Rezeptoren die de novo Lipogenese in Adipozyten aus dem Fettgewebe von Wistar-Ratten?
3. Lassen sich die evtl. beteiligten Rezeptoren pharmakologisch charakterisieren?
4. Haben Fettdepot, Alter und Geschlecht der Tiere Einfluss auf die Wirkungen extrazellulärer Nukleotide auf die Lipogenese?
5. Wird die lipogenesestimulierende Wirkung des Insulins durch P2-Rezeptoren beeinflusst?
6. Sind der basale und der insulinstimulierte Glukosetransport von der Regulation betroffen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Weibliche und männliche Han-Wistar-Ratten wurden im Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena gezüchtet. Sie wurden in einem 12h-Wechsel von Licht und Dunkelheit bei freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser gehalten. Die Tötung der Tiere erfolgte mit CO<sub>2</sub>. Das Fettgewebe wurde aus den verschiedenen Depots sofort entnommen und gewogen.

### 2.2 Reagenzien

2-Deoxy-Glukose, Cytochalasin B, ATP- $\gamma$ S, Diadenosintetraphosphat (A<sub>2</sub>P<sub>4</sub>), Adenosin, UTP, UDP, CTP, GTP, Insulin, Esterase, Lipase und Adenosindeaminase (ADA) wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) erworben. Rinderserumalbumin und Rotiszint 11 waren von Roth (Karlsruhe, Deutschland), CGS15943 von Research Biochemicals International (Natick, USA). D-[3-<sup>3</sup>H]-Glukose und D-[2,6-<sup>3</sup>H]-Glukose waren von NEN (Frankfurt, Deutschland). ATP, ADP,  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP,  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP, NADH, PEP, Glycerokinase, Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase wurden von Roche (Mannheim, Deutschland) erworben. HEPES war von Serva (Heidelberg, Deutschland). Silica Gel 60 Dünnschichtchromatographieplatten und Dinonylphtalat waren von Merck (Darmstadt, Deutschland).

### 2.3 Lösungen

Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer (KRH):

50mM HEPES (freie Säure)  
80mM NaCl  
6mM KCl  
2mM CaCl<sub>2</sub>  
1mM MgSO<sub>4</sub>

Der Puffer wurde auf pH 7,2 eingestellt.

**Kollagenase-Puffer:**

100mM HEPES  
120mM NaCl  
50mM KCl  
1mM  $\text{CaCl}_2$   
5mM Glukose

Der Puffer wurde auf pH 7,4 eingestellt.

**Reaktionsgemisch für 100 Tests zur Glyzerin-Messung:**

42,55 ml TRAM (100mM)  
1ml  $\text{MgCl}$  (850mM)  
2ml PEP (50mM)  
2ml NADH (20mM)  
2ml ATP (100mM)  
0,25ml Pyruvatkinase (2000 U/ml)  
0,2ml Laktatdehydrogenase (2750 U/ml)

**2.4 Isolierung der Adipozyten**

Aus den gonadalen und perirenen Fettdepots weiblicher oder männlicher Han-Wistar-Ratten wurde das Fettgewebe entnommen und die Gewebestückchen in KRH-Puffer zweimal gewaschen. Sichtbare Blutgefäße wurden entfernt. Nach der Zerkleinerung mit einer Schere wurden die Gewebestücke in einem 50ml Falcon-Röhrchen in der Kollagenaselösung (1ml Kollagenaselösung / g Gewebe) im Schüttler bei 180 U/min und einer Temperatur von 37° C für 25 Minuten verdaut (RODBELL, 1964). Das anschließende Filtern der Zellsuspension durch ein Nylon-Netz (250 µm Maschengröße) trennte größere, unverdaute Gewebestücke und Blutgefäße ab. Es erfolgte viermaliges Waschen der Zellen mit KRH-Puffer. Der Unterstand wurde mit einer Pipette abgesaugt, nachdem nach etwa einer Minute in der Zellsuspension die Fettzellen aufgeschwommen waren und eine eindeutige Trennung zwischen Puffer-

und Zellphase möglich war. Die so isolierten Adipozyten standen nun für die verschiedenen experimentellen Ansätze zur Verfügung.

## 2.5 Messung der Lipogenese

Die Grundlage der Lipogenesemessung bildet der Einbau von Tritium aus markierter 3-[<sup>3</sup>H]-D-Glukose in lipophile Verbindungen, die mittels Toluol extrahiert und direkt im Inkubationsansatz quantifiziert werden (MOODY et al., 1974; MÜLLER et al., 1997).

In 680µl KRH-Puffer (147µM D-Glukose) mit 5µl CGS 15943 (40µM) und einem den weiteren Zusätzen entsprechenden Volumen KRH-Puffer (33µM D-Glukose, 1% BSA) wurden in ein auf 37°C vorgewärmtes 20ml Szintillationsgefäß jeweils 100µl Fettzellsuspension pro Ansatz gegeben. Nach Zugabe der Agonisten wurden die Ansätze für 20 min bei 37° C inkubiert. Danach wurde der Einbau der radioaktiven Glukose mit der Zugabe von 100µl radioaktiv markierter 3-[<sup>3</sup>H]-D-Glukose (0,5µCi / 100µl KRH-Puffer (33µM D-Glukose, 1% BSA)) gestartet und die Szintillationsgefäße bei geschlossenem Deckel bei 37°C warm gestellt. Nach 90 Minuten beendete die Zupipettierung von 10 ml Rotiszint 11 die Inkorporation der radioaktiven Glukose. Die Messung der Radioaktivität in den toluollöslichen Verbindungen erfolgte nach kräftigem Schütteln der Szintillationsgefäße und Stehenlassen für 30 Minuten in Dunkelheit in einem β-Counter (Packard). Die Messung der Lipogenese erfolgte in Dreifach-Ansätzen. Der Mittelwert der Leeransätze wurde als Hintergrundaktivität von den Messergebnissen abgezogen. Als Leerwert wurden die Ergebnisse aus Dreifach-Ansätzen ohne Adipozyten, als Kontrollwert die Ergebnisse aus Dreifach-Ansätzen mit Adipozyten aber ohne Agonisten gemessen.

Beispielansatz:

- 680µl KRH (147µM Glukose)
- 105µl KRH (33µM Glukose, 1% Albumin)
- 5µl CGS15943 (40µM)
- 100µl Fettzellsuspension
- 10µl ATP (5mM)
- 100µl KRH (5µCi 3-[<sup>3</sup>H]-D-Glukose/ml)



Endkonzentrationen in 1 ml Testansatz:

D-Glukose	100µM
3-[ <sup>3</sup> H]-D-Glukose	0,05µCi/ml
CGS15943	200nM
ATP	50µM

## 2.6 Messung des Glukosetransports

Zur Bestimmung des Glukosetransports wurde die Aufnahme von 2-Deoxy-2-6-[<sup>3</sup>H]-D-Glukose in Fettzellen gemessen (GLIEMANN et al., 1972; MÜLLER et al., 1997). Diese Substanz unterliegt in der Zelle keinem Abbau und akkumuliert sich als Deoxyglukose-6-Phosphat in den Zellen.

100µl der Fettzellsuspension wurden mit 100µl KRH-Puffer (33µM Glucose, 1% BSA) verdünnt und mit 1µl CGS (40µM) in Ab- oder Anwesenheit der zu untersuchenden Substanzen für 15 Minuten bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die radioaktive 2-Deoxy-2-6-[<sup>3</sup>H]-D-Glukose in 100µl KRH Puffer (0,3mM 2-Deoxy-Glukose, 4µCi / ml KRH-Puffer) in die Ansätze pipettiert und nach weiteren 15 Minuten bei 37°C im Schüttler die Deoxy-2-6-[<sup>3</sup>H]-D-Glukoseaufnahme gemessen. Dafür wurden 100µl des Testansatzes auf 250µl Dinonylphtalat in einem 400µl Beckmann-Tube pipettiert. Die Aufnahme der Deoxyglukose wurde gestoppt durch Cytochalasin B, einem Inhibitor der Glukosetransporter, von dem 10µl einer 200µM Lösung schon vor Versuchsbeginn auf das Dinonylphtalat gegeben worden waren. Die Zellen wurden dann sofort bei 2000rpm in einer Zentrifuge von der wässrigen Phase getrennt. Nach dem Abtrennen des Deckels erfolgte das Durchtrennen des Beckmann-Tube inmitten der öligen Phase. Der obere Teil des Cups mit den Fettzellen wurde in ein 5ml Szintillationsgefäß gegeben und mit 4ml Szinter (Ultima Gold) versetzt. Der untere Teil mit der wässrigen Phase wurde verworfen. Die Szintillationsgefäße wurden für 10 Sekunden gevortext und danach für 45 Minuten geschüttelt. Die Ansätze wurden anschließend erneut für 10 Sekunden gevortext und nach 30 Minuten in Dunkelheit im β-Counter (Packard) ausgezählt. Jede Versuchsanordnung mit den unterschiedlichen Agonisten wurde in vier Experimentansätzen gemessen.

Von allen Ergebnissen wurde der Mittelwert von vier Ansätzen abgezogen, in denen die Zellen mit Cytochalasin B vorinkubiert waren, wodurch eine Aufnahme von Deoxy-2-6- $^3\text{H}$ -D-Glukose in die Zellen verhindert wurde.

Beispielansatz:

100  $\mu\text{l}$  KRH(33 $\mu\text{M}$  Glukose, 1% Albumin)  
100  $\mu\text{l}$  Fettzellsuspension  
1  $\mu\text{l}$  CGS15943 (40 $\mu\text{M}$ )  
2  $\mu\text{l}$  ATP (5mM)  
100  $\mu\text{l}$  KRH (0,3 mM Deoxyglukose, 2-  
Deoxy-2-6- $^3\text{H}$ -D-Glukose 4 $\mu\text{Ci/ml}$ )

Konzentrationen in 200 $\mu\text{l}$  Testansatz vor Zugabe von Deoxy-2-6- $^3\text{H}$ -D-Glukose:

CGS15943	200nM
ATP	50 $\mu\text{M}$

Endkonzentrationen der Glukoseverbindungen:

Deoxyglukose	100 $\mu\text{M}$
Deoxy-2-6- $^3\text{H}$ -D-Glukose	1,33 $\mu\text{Ci/ml}$

## 2.7 Bestimmung der Triglyzeridkonzentration

Die Ergebnisse aus den verschiedenen Zellpräparationen wurden normalisiert. Als Parameter, der einen guten Vergleich zwischen Präparationen erlaubt, bietet sich die Triglyzeridkonzentration an. Adipozyten bestehen zum größten Teil (99%) aus Triglyzeriden.

Die Messung der Triglyzeridkonzentration erfolgte durch eine enzymatische Bestimmung (WAHLEFELD, 1974), bei der die Triglyzeride durch Lipase und Esterase aufgespalten werden und das entstehende Glycerin anschließend glykolytisch weiterreagiert. Die Änderung der NADH-Konzentration in den Versuchsansätzen wurde gemessen.

Aliquots (300-500µl) aus den gewaschenen Zellpräparationen wurden entnommen und tiefgefroren. Zum Messtermin wurde die Suspension nach dem Wiederauftauen für ca. 15 Sekunden beschallt und 100µl der Emulsion in 900µl 3,5%iger Gummi-Arabicum-Suspension (6% BSA) pipettiert. Die Proben wurden nun für 90 Sekunden beschallt. Die Lipide wurden so auf den Gummi-Arabicum-Partikeln gebunden. Die Proben wurden 1:20 mit 6%iger BSA-Lösung verdünnt. Diese Suspension in der Endverdünnung von 1/200 stand nun für die Glycerinbestimmung zur Verfügung.

Zum Reaktionsgemisch (s. Lösungen), H<sub>2</sub>O, Lipase (5,4 U/µl) und der Esterase (3,75 U/µl), die in einer Küvette erwärmt wurden, wurden 50µl der zu untersuchenden Testlösung pipettiert (Beispielansatz s. u.). Mit dem Schütteln der Küvetten startete das Aufspalten der Triglyzeride in Glycerin und Fettsäuren. Die Küvetten wurden in ein Photometer gestellt und die Lichtabsorption des NADH bei einer Wellenlänge von 340nm als Baseline minütlich über fünf Minuten gemessen. Die folgende Zugabe von 1µl α-Glyzerokinase (425 U/ml) und das erneute Schütteln der Probe startet in den Küvetten den enzymatischen Abbau des Glycerins. Die dadurch bedingte Änderung der Lichtabsorption wurde wiederum minütlich bis 16 Minuten nach Versuchsstart gemessen. Es trat dann keine Änderung mehr auf. Die Bestimmung der Absorptionsänderung erfolgte in doppelten Ansätzen. Die Auswertung wurde graphisch durchgeführt.

Der Berechnung der Triglyzeridmenge lag Triolein als Standardtriglyzerid in den Adipozyten zugrunde. Die Anzahl der Kohlenstoffatome dieses Triglyzerids entspricht der durchschnittlichen Zahl der Kohlenstoffatome in Triglyzeriden des Fettgewebes. Die Triglyzeridkonzentration wurde mit Hilfe des Lambert-Beer Gesetzes berechnet:

$$\Delta E = \varepsilon \times c \times d$$

$\Delta E$  = Extinktionsänderung,  $\varepsilon$  = millimolarer dekadischer Extinktionskoeffizient (6,3 l/mmol x cm),  $d$  = Schichtdicke der Küvette (1cm)

$$c_{\text{Glycerin}} = \Delta E \times V_{\text{ges}} / \varepsilon \times d \times V_{\text{Probe}}$$

$V_{\text{ges}}$  = Volumen in der Küvette (1001µl),  $V_{\text{Probe}}$  = Volumen der eingesetzten Testlösung (50µl)

$$C_{\text{Glycerin}} = \Delta E \times (1001 / 6,3 \times 1 \times 50) \text{ mmol/l} = \Delta E \times 3,18 \text{ mmol/l}$$

Zur Errechnung der Triglyzeridkonzentration mit dem Massengewicht für Triolein (885,46 g/mol) und dem Verdünnungsfaktor der Ausgangsprobe (200):

$$\begin{aligned} C_{\text{Triolein}} &= \Delta E \times 3,18 \text{ mmol/l} \times 885,46 \text{ mg/mmol} \times 200 = \Delta E \times 562759 \text{ mg/l} \\ &= \Delta E \times 562,76 \text{ g/l} \end{aligned}$$

Beispielansatz:

500µl Reagenzienmix  
100µl TRAM (100mM)  
331µl Aqua destillata  
5µl Lipase  
13,9µl Esterase  
50µl Testlösung  
1µl Glyzerokinase

## 2.8 Dünnschichtchromatographie

Der prinzipielle Versuchsansatz entspricht dem unter 2.5 beschriebenen Lipogenesetest. Jedoch wurden die Lipide der Testansätze mit Toluol extrahiert und die Extrakte im Vakuum-Konzentrator für eine Stunde getrocknet. Aus einem Testansatz wurden ca. 500µl Lipide / ml getrennt. Diese wurden in Chloroform zum Endvolumen von 500µl gelöst und 5µl dieser Lösung auf eine Silika 60 Aluminium Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Trennung erfolgte im Laufmittel aus Hexan, Diethylether, Essigsäure (80:20:1). Die Standardspuren wurden abgetrennt und mit Kaliumpermanganat bei 160°C gefärbt. Anschließend wurden die zu analysierenden Spots identifiziert, ausgeschnitten und die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen nach Lösung der Lipide in Rotiszint 11 im  $\beta$ -Counter ausgezählt.

Als Kontrolle auf den Dünnschichtplatten lief ein Standard aus Phospholipiden, Ölsäure und Triglyzeriden.

## **2.9 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit der SigmaStat Software (SPSS, Erkrath, Deutschland). Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit Student's-t-Test identifiziert und bei  $p < 0,05$  als signifikant anerkannt. Der Varianzvergleich zwischen mehreren Gruppen erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit Tukey's Test zum paarweisen Vergleich der Gruppen, oder Kruskal-Wallis Rangsummen-ANOVA mit Dunn's Test zum paarweisen Vergleich der Gruppen, falls für eine der zu untersuchenden Gruppen keine Normalverteilung der Daten vorlag.

### **3 Ergebnisse**

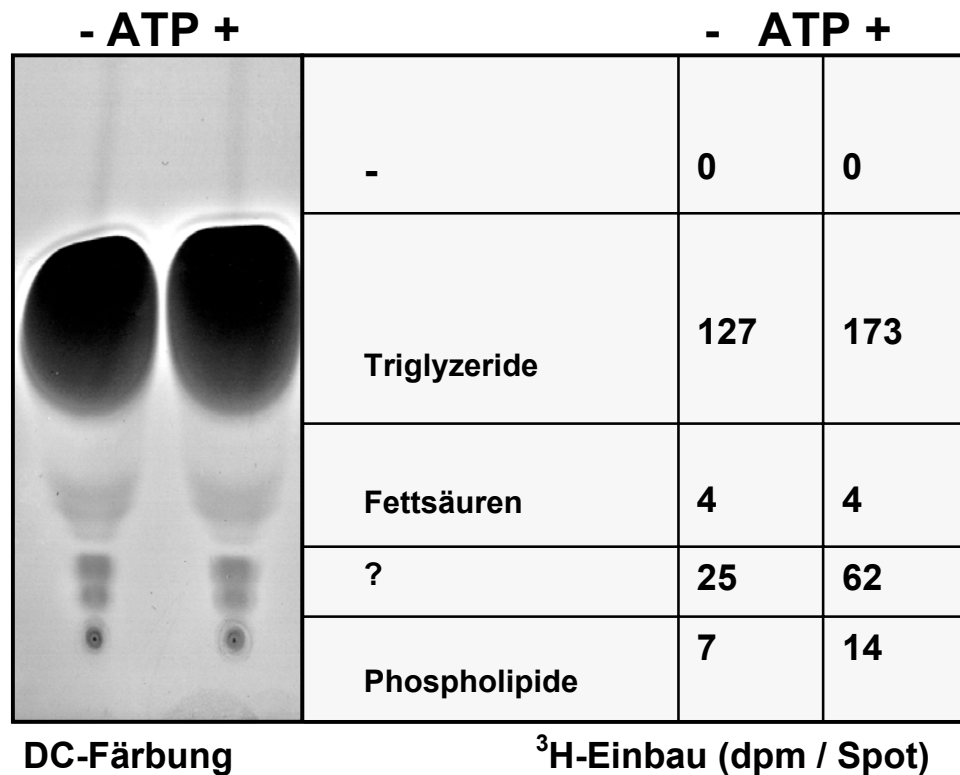
#### **3.1 Regulation der Lipogenese durch Adeninnukleotide in Adipozyten**

##### **3.1.1 Extrazelluläres Adenosintriphosphat stimuliert die Lipogenese in isolierten Adipozyten**

###### **3.1.1.1 ATP stimuliert den Einbau von Tritium aus D-[3-<sup>3</sup>H]-Glukose in Triglyzeride**

Um einen möglichen Einfluss extrazellulärer Nukleotide auf die Lipogenese in frisch isolierten Adipozyten zu bestimmen, wurden zunächst Lipide aus den jeweiligen Testansätzen auf den Einbau von Tritium aus D-[3-<sup>3</sup>H]-Glukose untersucht.

Das Fettgewebe wurde aus dem gonadalen Depot männlicher Wistar-Ratten (Alter: 4 Monate) entnommen und die Adipozyten durch Kollagenaseverdau nach der Methode von Rodbell isoliert. Zellaliquots wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit D-[3-<sup>3</sup>H]-Glukose in An- bzw. Abwesenheit von 50µM ATP inkubiert und die Lipide anschließend mit Toluol extrahiert. Die Trennung der Lipide durch Dünnschichtchromatographie und die Zählung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen zeigt den Einbau des Tritiums zum überwiegenden Teil in Triglyzeride. Daneben ist die Radioaktivität in der Fraktion der Phospholipide sowie in einer nicht einem Standard zuzuordnenden Fraktion der ATP-stimulierten Adipozyten im Vergleich zu den unstimulierten Adipozyten erhöht. Extrazelluläres ATP hat aber keinen Effekt auf die gemessene Radioaktivität in freien Fettsäuren (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1 Der Einbau des Tritiums erfolgt überwiegend in Triglyzeride.**

Die Lipide der Testansätze wurden mit Toluol extrahiert, anschließend im Vakuum-Konzentrator getrocknet und auf eine Silika 60 Aluminium-Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Trennung erfolgte im Laufmittel aus Hexan, Diethylether, Essigsäure (80:20:1). Die Standardspuren wurden mit Kaliumpermanganat gefärbt. Die ungefärbten Testansätze wurden anschließend entsprechend dem obigen Schema ausgeschnitten und die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen ausgezählt. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von zwei Experimenten. DC – Dünnschichtchromatographie; ? – unidentifizierte Spots.

### 3.1.1.2 ATP stimuliert in Gegenwart von Adenosindeaminase und CGS15943

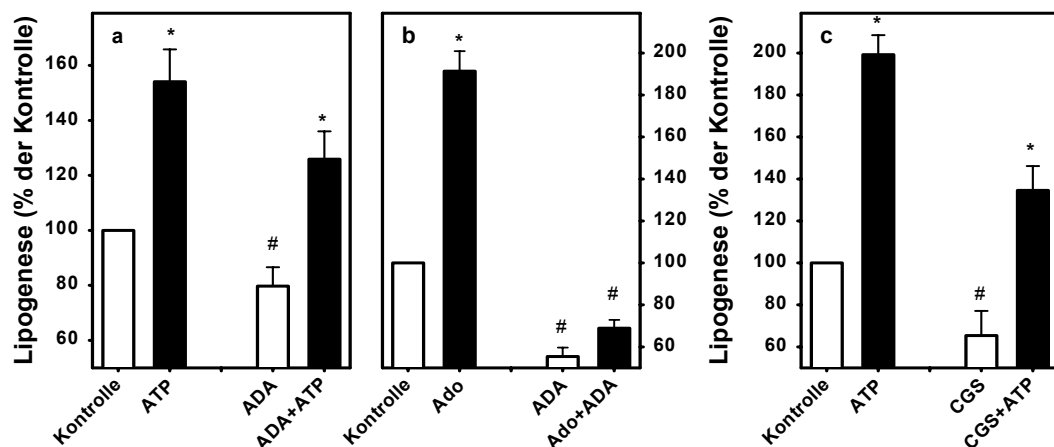
Für die weiteren Untersuchungen wurde von nun an mit dem Bioassay nach Moody eine Methode verwendet, die es gestattet, eine größere Zahl Versuchsansätze auf Lipogeneseaktivität zu testen. Hierbei erfolgt die Extraktion der Lipide aus den Adipozyten direkt mit einem Szintillationsgemisch auf Toluolbasis und die Messung der Radioaktivität in einem  $\beta$ -Counter. Mit dieser Methode kann der Einfluss des extrazellulären ATP auf die Lipogenese in Adipozyten von männlichen Wistar-Ratten (Alter: 4 Monate) gezeigt werden. ATP stimuliert den Einbau von Tritium aus D-[3-<sup>3</sup>H]Glukose in lipophile Verbindungen in frisch isolierten Fettzellen um  $54 \pm 12\%$ . Der

Effekt ist unabhängig von Insulin, das in Parallelansätzen die Lipogenese um  $289 \pm 33\%$  stimuliert. ATP stimuliert in Gegenwart von Adenosindeaminase (ADA) signifikant (Abb. 3.2a). Da die eingesetzten Mengen an ADA ausreichend waren, die Wirkung von Adenosin vollständig aufzuheben (Abb. 3.2b), kann eine Stimulierung der Lipogenese über den Abbau des ATP zu Adenosin ausgeschlossen werden.

Der stimulierende Effekt von ATP auf die Lipogenese läßt sich auch in der Anwesenheit des P1-Rezeptorantagonisten CGS15943 messen (Abb. 3.2c).

ATP wirkt also nicht über den Abbau zu Adenosin und dessen anschließender Aktivierung von P1-Rezeptoren.

Die Kontrollwerte der Lipogenese sinken in der Gegenwart von ADA und CGS15943 ab. Man kann daher von einer basalen Wirkung des Adenosins auf die Lipogenese in den Fettzellpräparationen ausgehen.



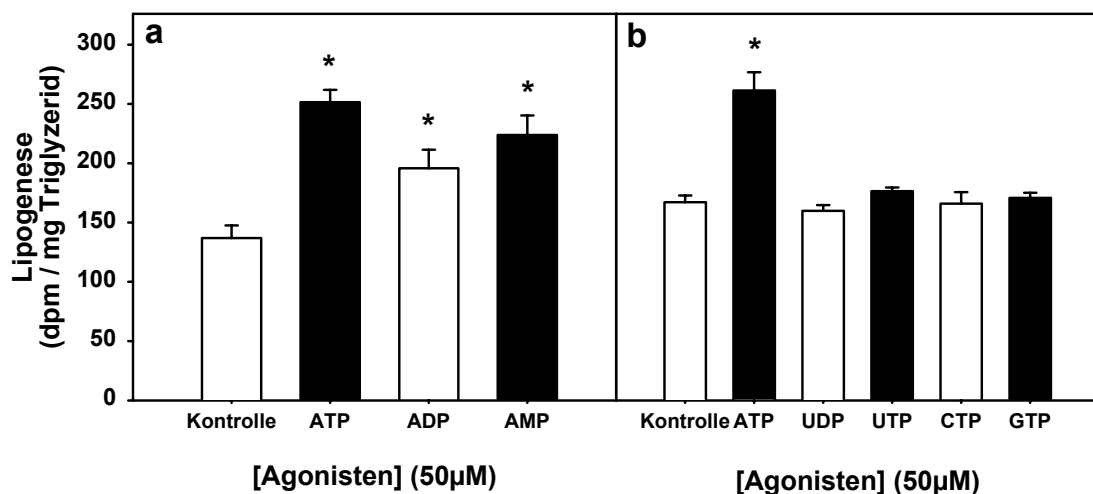
**Abb. 3.2 ATP stimuliert die Lipogenese in An- und Abwesenheit von Adenosindeaminase oder des P1-Rezeptorantagonisten CGS15943.**

Die isolierten Adipozyten wurden, wie angegeben, mit  $50 \mu\text{M}$  ATP bzw. Adenosin (Ado),  $150 \text{ mU/ml}$  Adenosindeaminase (ADA) oder  $200 \text{ nM}$  CGS15943 (CGS) inkubiert. Die Messung des Einbaus von Tritium aus D-[ $3\text{-}^3\text{H}$ ]Glukose in lipophile Verbindungen erfolgte nach Extraktion mit toluolhaltigem Szinter im  $\beta$ -Counter. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die relativen Aktivitäten in Bezug auf die Kontrolle angegeben (absoluter Mittelwert $\pm$ SD der Kontrolle von 3.2c:  $171 \pm 24 \text{ dpm/mg Triglyzerid}$ ). Zusätzlich zur Stimulierung der Lipogenese durch ATP ist die hemmende Wirkung der ADA (a) bzw. des CGS15943 (c) auf die basale Lipogenese signifikant. Der stimulierende Effekt des Adenosins (b) wird durch ADA gehemmt. Bei Schmidt hemmt eine noch kleinere Konzentration die Wirkung von  $500 \mu\text{M}$  Adenosin (SCHMIDT und LÖFFLER, 1998). Gezeigt sind Mittelwerte $\pm$ SD von (a) sieben, (b) einem und (c) drei Experimenten in dreifachen Ansätzen. \*, Unterschiede signifikant gegenüber korrespondierenden Ansätzen ohne ATP bzw. Adenosin. #, Unterschiede signifikant zur Kontrolle. Student's t-Test,  $p < 0,05$ .



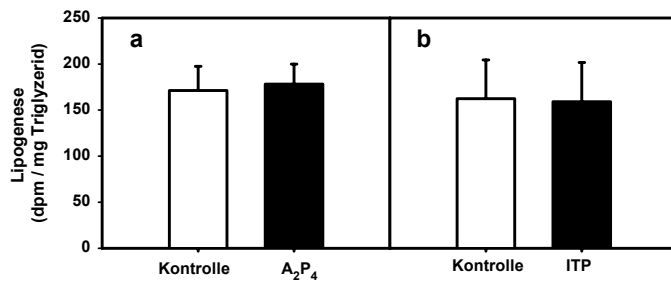
### 3.1.2 Nur Adenin-Verbindungen stimulieren die Lipogenese

Um Informationen über die Ligandenselektivität des für den Effekt von ATP verantwortlichen Rezeptors zu erhalten, wurden eine Reihe natürlich vorkommender P2-Rezeptor-Liganden und chemisch ähnliche Verbindungen getestet. Neben ATP zeigen die Adeninderivate ADP und AMP eine stimulierende Wirkung (Abb. 3.3a). Sie könnten als partielle Agonisten an den lipogenesestimulierenden Rezeptor binden. Dagegen haben andere Nukleotide (UTP, UDP, CTP, GTP, ITP) und Diadenosintetraphosphat ( $A_2P_4$ ) keinen Effekt auf die Lipogenese in isolierten Adipozyten (Abb. 3.3b und Abb. 3.4). Die Wirkung von ADP ist signifikant schwächer als die von ATP. Auch in der Dosis-Wirkung-Beziehung setzt ein stimulierender Effekt von ADP erst bei Konzentrationen von  $50\mu\text{M}$  ein, während ATP und AMP schon in Konzentrationen von  $5\mu\text{M}$  die Lipogenese signifikant stimulieren (Abb. 3.5).



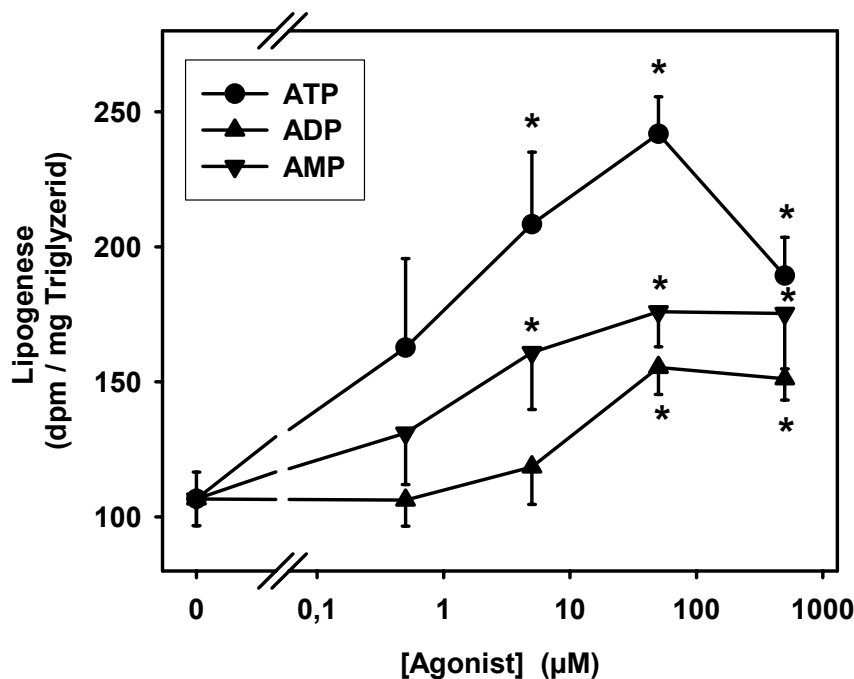
**Abb. 3.3 Nur Adeninderivate stimulieren die Lipogenese.**

In Gegenwart von 200nM CGS15943 wurden die Nukleotide jeweils in einer Konzentration von  $50\mu\text{M}$  eingesetzt. (a) Mittelwerte $\pm$ SD von vier Experimenten in dreifachen Ansätzen. \*, Unterschiede signifikant gegenüber der Kontrolle, ANOVA mit Tukey Test,  $p < 0,05$ . Die Wirkung von ADP unterscheidet sich auch signifikant von der des ATP. (b) Mittelwerte $\pm$ SD von zwei Experimenten in dreifachen Ansätzen. \*, Student's t-Test,  $p > 0,05$ .



**Abb. 3.4 Diadenosintetraphosphat (A<sub>2</sub>P<sub>4</sub>) und ITP beeinflussen die Lipogenese nicht.**

Die Adipozyten wurden mit jeweils 50μM Agonist inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf (a) bzw. zwei (b) Experimenten in dreifachen Ansätzen.



**Abb. 3.5 Dosis-Wirkungs-Beziehung der Adeninnukleotide.**

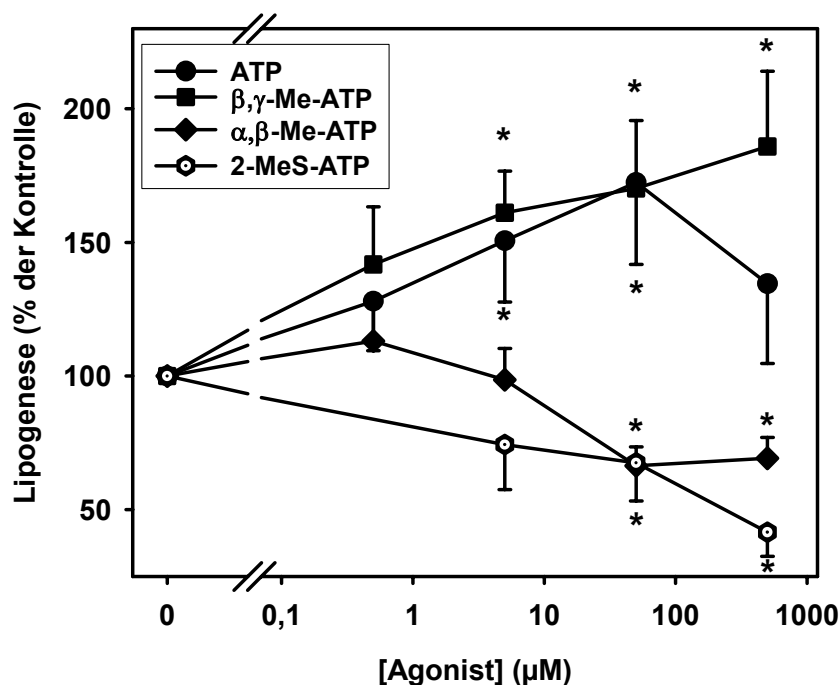
Dargestellt ist die Abhängigkeit der Lipogenese von der Konzentration extrazellulärer Adeninnukleotide. Alle mit \* markierten Werte unterscheiden sich signifikant vom Mittelwert der Kontrolle.

Student's t-Test,  $p < 0,05$ . Ergebnisse aus zwei Adipozytenpräparationen in dreifachen Ansätzen.

### 3.1.3 Synthetische P2-Rezeptor-Agonisten: $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP als P2-Agonist mit stimulierender Wirkung, $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und 2-MeS-ATP als P2-Agonisten mit hemmender Wirkung auf die Lipogenese

Der Einsatz von synthetischen und gegenüber Abbau durch Nukleotidasen stabilen Nukleotiden ( $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP,  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP) ermöglicht eine genauere pharmakologische Charakterisierung der P2-Rezeptoren, die an der Regulation der Lipogenese beteiligt sind. Es wurden die subtypselektiven Agonisten  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP,  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP, 2-MeS-ATP und ATP- $\gamma$ -S, die üblicherweise zur Charakterisierung von P2-Rezeptoren verwendet werden, eingesetzt. ATP- $\gamma$ -S hat keinen Einfluß auf die Lipogenese (Daten nicht gezeigt).  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP stimuliert

die Lipogenese in den Adipozyten.  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und 2-MeS-ATP hingegen hemmen die Lipogenese (Abb. 3.6). Die Dosis-Wirkungs-Beziehung von ATP zeigt einen biphasischen Verlauf. In Konzentrationen von 5  $\mu$ M bis 50  $\mu$ M ist ein signifikanter, stimulierender Effekt sichtbar, während 500  $\mu$ M nicht (signifikant) stimulieren. Diese Ergebnisse weisen auf ein Zusammenspiel mindestens zweier P2-Rezeptoren, eines stimulierenden und eines hemmenden Rezeptors, bei der Regulation der Lipogenese in Adipozyten durch Nukleotide hin.

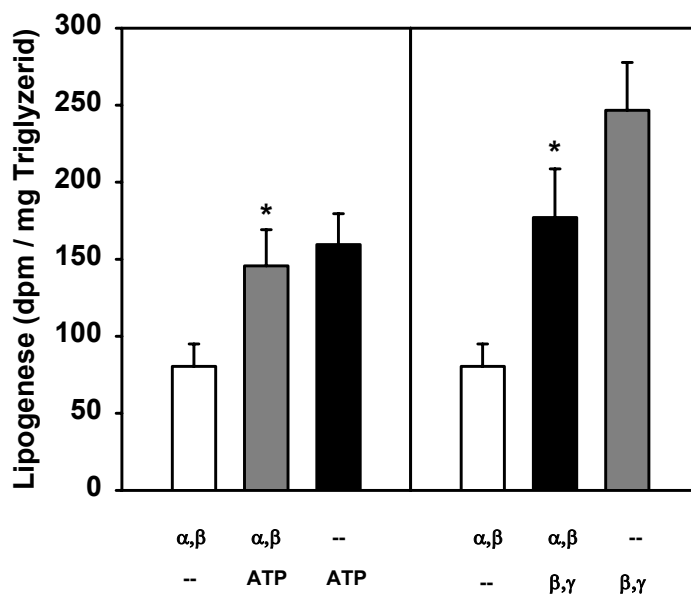


**Abb. 3.6 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Agonisten.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von jeweils drei Experimenten in dreifachen Ansätzen. Alle mit \* gekennzeichneten Werte unterscheiden sich signifikant vom Mittelwert der Kontrolle. Student's t-Test,  $p < 0,05$ .

#### 3.1.4 $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP zeigt keine komplette Hemmung der Wirkung stimulierender Agonisten

In den folgenden Untersuchungen wurde der Effekt von  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP auf die stimulierenden Agonisten ATP und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP untersucht, da diese Substanz an einzelnen P2X-Rezeptoren (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>) als Ligand mit desensibilisierender Wirkung beschrieben wurde.

Bei der Kombination von stimulierenden Agonisten mit dem hemmenden Agonisten  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP ist weiterhin ein Effekt der stimulierenden Agonisten festzustellen. Damit kann eine desensibilisierende Wirkung von  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP an einem stimulierenden Rezeptor ausgeschlossen werden (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7 Kombination eines lipogenesehemmenden Agonisten mit lipogenesestimulierenden Agonisten.**

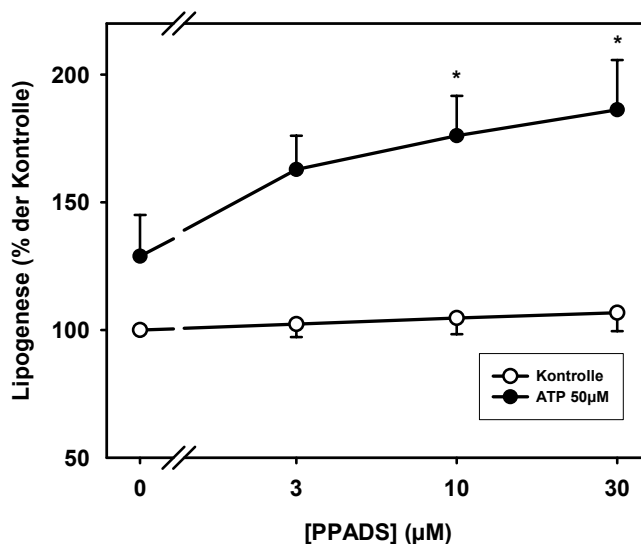
Die isolierten Adipozyten wurden mit ATP,  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP ( $\alpha,\beta$ ) und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP ( $\beta,\gamma$ ) in Konzentrationen von 50  $\mu$ M dem nebenstehenden Schema folgend inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Experimenten in dreifachen Ansätzen. Die Werte sind signifikant im Vergleich zu den Ansätzen mit  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP allein. \*, Student's t-Test,  $p < 0,05$ .

### 3.1.5 Die Wirkung von P2-Rezeptor Antagonisten

Das Agonistenprofil lässt noch keine genaue Bestimmung der P2-Rezeptoren, die an der Regulation der Lipogenese in Adipozyten beteiligt sind, zu, so dass zur weiteren Charakterisierung der P2-Rezeptoren verschiedene P2-Rezeptor-Antagonisten herangezogen wurden.

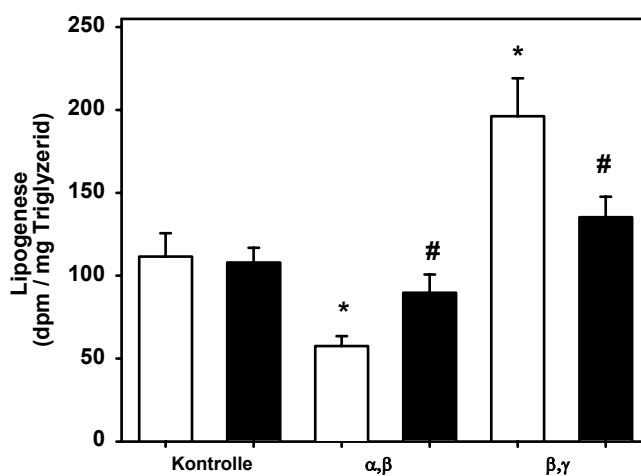
### 3.1.5.1 Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure erhöht die stimulierende Wirkung von ATP und hemmt die Wirkungen von $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP

Beim Einsatz verschiedener Konzentrationen (3-30 $\mu$ M) hat Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure (PPADS) in Konzentrationen ab 10 $\mu$ M einen stimulierenden Effekt auf die Wirkung des P2-Rezeptor-Agonisten ATP (Abb. 3.8). PPADS zeigt bei der getesteten Konzentration von 10 $\mu$ M signifikant hemmende Wirkungen auf die Effekte des lipogenesehemmenden Agonisten  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und des lipogenesestimulierenden  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP (Abb. 3.9).



**Abb. 3.8 Der P2-Rezeptor-Antagonist PPADS verstärkt die Wirkung von 50 $\mu$ M ATP auf die Lipogenese.**

Die Zellen wurden 10 Minuten vor ATP-Zugabe mit dem Antagonisten inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD der relativen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle von vier Experimenten in dreifachen Ansätzen. Ab 10 $\mu$ M PPADS besteht ein signifikanter Unterschied zu den ATP-Ansätzen ohne PPADS. \*, Student's t-Test,  $p < 0,05$ .

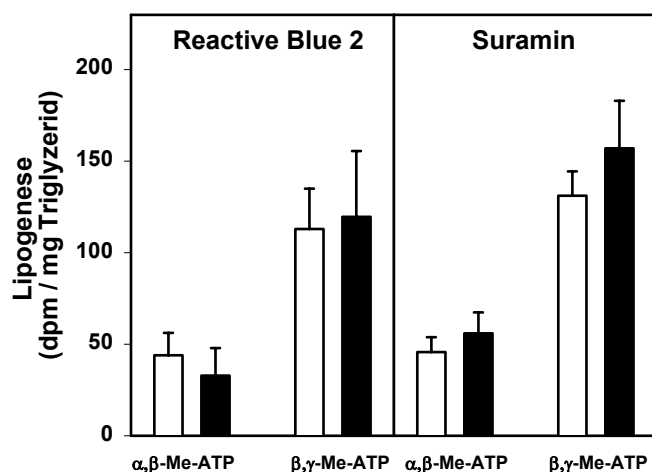


**Abb. 3.9 PPADS hemmt die Wirkungen der subtypelektiven, synthetischen Agonisten.**

$\alpha,\beta$ -Methylen-ATP ( $\alpha,\beta$ ) und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP ( $\beta,\gamma$ ) wurden in Konzentrationen von 50 $\mu$ M ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) 10 $\mu$ M PPADS eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus vier Experimenten (Triplikate). \*, Unterschied signifikant zur Kontrolle, Student's t-Test,  $p < 0,005$ ; #, Unterschied signifikant zu den jeweiligen Ansätzen ohne PPADS, Student's t-Test,  $p < 0,05$ .

### 3.1.5.2 Suramin und Reactive Blue 2 beeinflussen die Nukleotideffekte auf die Lipogenese nicht

Die P2-Rezeptor-Antagonisten Suramin und Reactive Blue 2 zeigen in Konzentrationen, die zur Hemmung von P2-Rezeptoren verwendet werden, keine Effekte auf die Wirkung von ATP (Daten nicht gezeigt). In höheren Konzentrationen zeigt Suramin allein stimulierende Wirkungen auf die Lipogenese, die auf unspezifische nicht über P2-Rezeptoren vermittelte Signale zurückgeführt werden müssen. Beide Hemmstoffe haben in Konzentrationen von 10  $\mu$ M keinen Einfluß auf die Wirkungen von  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10 Reactive Blue 2 und Suramin wirken nicht auf die Effekte synthetischer Nukleotide.**

Die Agonisten wurden in der Konzentration von 50  $\mu$ M jeweils ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) 10  $\mu$ M Antagonist (Suramin oder Reactive Blue 2) getestet. Die Zellen wurden 10 Minuten vor Zugabe der Agonisten mit den Antagonisten inkubiert. Mittelwerte  $\pm$  SD von vier Experimenten in dreifachen Ansätzen.

### 3.2 Die Lipogenese und ihre Beeinflussung durch Nukleotide sind abhängig von Alter, Geschlecht und Fettdepot

Die bisherigen Ergebnisse aus Experimenten mit männlichen Tieren im Alter von 4 Monaten demonstrieren eine komplexe Verschaltung mindestens zweier P2-Rezeptoren zur Regulation der Lipogenese in Adipozyten. Die synthetischen Agonisten  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP inhibieren bzw. stimulieren die Lipogenese.

Die folgenden Versuche haben zum Ziel, Differenzen in den Wirkungen der zwei synthetischen Agonisten  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP hinsichtlich Alter,

Fettdepot und Geschlecht zu beschreiben. Die Nukleotide wurden in allen Experimenten in der Konzentration 50 $\mu$ M eingesetzt.

Das Fettgewebe wurde aus Tieren in den Altersstufen 4, 6 und 12 Monate entnommen. Für jedes Alter wurde der Effekt der extrazellulären Nukleotide auf die Zellen beider Geschlechter im gonadalen und perirenenalen Fettgewebe gemessen (Abb. 3.11 und 3.12).

### **3.2.1 Unterschiede in der basalen Lipogeneseaktivität der untersuchten Gruppen**

Die basale Aktivität der Lipogenese bei männlichen Tieren sinkt zwischen dem 4. und 6. Lebensmonat, steigt aber bis zum 12. Lebensmonat signifikant an (Abb. 3.11a und 3.12a).

Die Basalaktivität der Lipogenese bei weiblichen Ratten nimmt mit dem Alter stetig zu (Abb. 3.11c und 3.12c).

Synthetisieren jüngere weibliche Tiere basal weniger Lipide als junge männliche, so zeigen ältere weibliche Tiere eine größere Bereitschaft zur Lipogenese als gleichaltrige männliche.

### **3.2.2 Die Wirkungen der Nukleotide auf Adipozyten von männlichen Tieren**

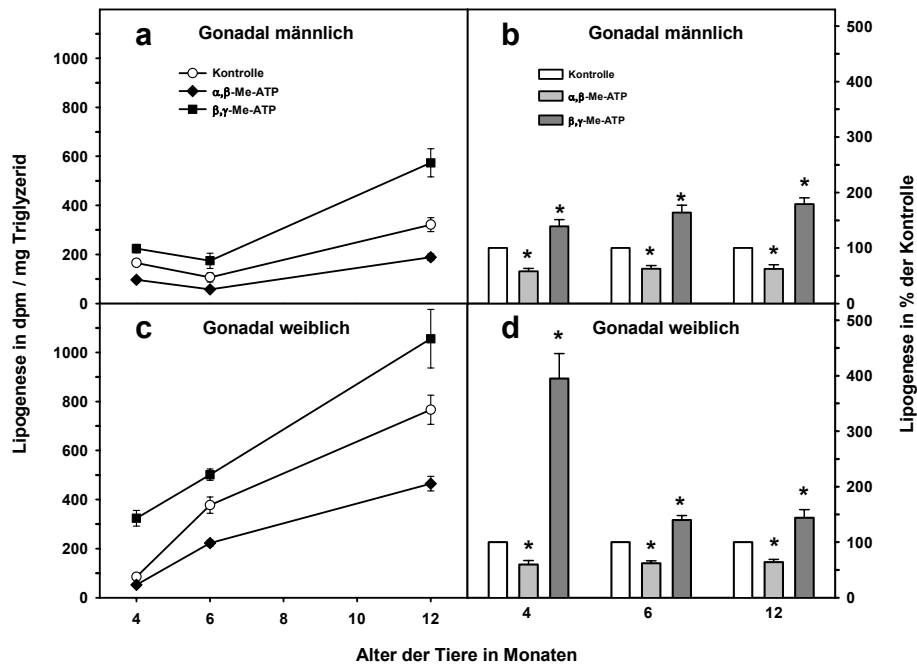
In Adipozyten aus den gonadalen und perirenenalen Fettdepots der männlichen Tiere hemmt der Agonist  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP die Lipogenese altersunabhängig.

$\beta,\gamma$ -Methylen-ATP wirkt als stimulierender Agonist auf Zellen aus allen untersuchten Fettdepots und Altersklassen (Abb. 3.11b und 3.12b).

### **3.2.3 Die Wirkungen der Nukleotide auf Adipozyten von weiblichen Tieren**

In beiden untersuchten Depots und allen Altersklassen hemmt  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP bei steigender Basalaktivität die Lipogenese signifikant.

$\beta,\gamma$ -Methylen-ATP wirkt in allen drei Altersklassen signifikant stimulierend. Es erhöht die Lipogenese bei Tieren im Alter von 4 Monaten um das 4-fache im gonadalen bzw. um mehr als das 2,5-fache im perirenenalen Fettgewebe (Abb. 3.11d und 3.12d).



**Abb. 3.11 Die Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der Wirkungen von Nukleotiden auf die basale Lipogenese im gonadalen Fettgewebe.**

Dargestellt sind die Effekte von  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP ( $\alpha,\beta$ -Me-ATP) und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP ( $\beta,\gamma$ -Me-ATP) auf die basale Lipogenese in Adipozyten aus dem gonadalen Fettgewebe männlicher und weiblicher Ratten ( $n=4$  für jede Gruppe) im Alter von 4,6 bzw. 12 Monaten. Abb. 3.11a und 3.11c zeigen die absoluten Werte der Lipogenese, Abb. 3.11b und 3.11d die relativen Effekte der Nukleotide, bezogen auf die korrespondierenden Kontrollansätze. \*, Unterschiede zu den Kontrollen sind signifikant, Student's t-Test,  $p<0,05$ .

### 3.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Wirkung extrazellulärer Nukleotide auf die basale Lipogenese in Adipozyten

Die Wirkungen der extrazellulären Nukleotide sind in den beiden Fettdepots der männlichen bzw. der weiblichen Tiere annähernd gleich ausgeprägt.

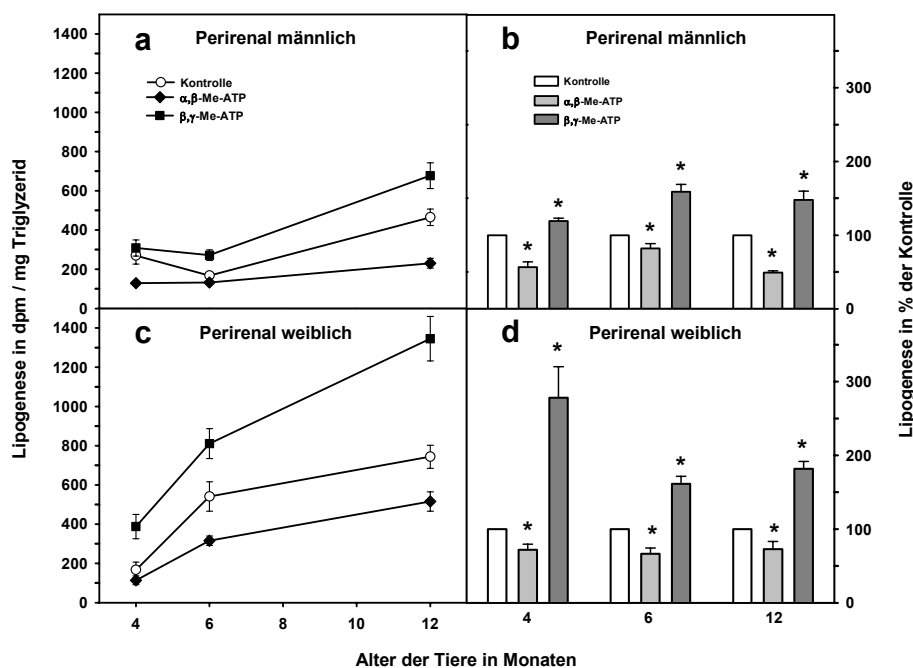
Im Altersverlauf der weiblichen Tiere steigt die basalen Lipogeneserate kontinuierlich an. Bei den männlichen Tieren im Alter von 6 Monaten zeigt sich allerdings eine temporäre Erniedrigung der basalen Lipogeneserate im Vergleich zu den jüngeren Tieren (Abb. 3.11a,c und 3.12a,c).



Die Inhibierung der Lipogenese durch  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP erfolgt in beiden Geschlechtern konstant ohne Abhängigkeit von Alter und Geschlecht.

Es fällt auf, dass  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP bei jungen, weiblichen Tieren eine ausgeprägte Stimulierung der Lipogenese in beiden Depots bewirkt. Mit dem fortschreitenden Alter und damit auch dem Anstieg der basalen Lipogenese nimmt der Einfluss des stimulierenden Agonisten bei weiblichen Tieren ab (Abb. 3.11d und 3.12d).

Im Gegensatz dazu ist für  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP bei männlichen Tieren eine annähernd konstante Stimulierung der Lipogenese zu beobachten (Abb. 3.11b und 3.12b).



**Abb. 3.12 Die Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der Wirkungen von Nukleotiden auf die basale Lipogenese im perirenal Fettgewebe.**

Dargestellt sind die Effekte von  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP ( $\alpha,\beta$ -Me-ATP) und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP ( $\beta,\gamma$ -Me-ATP) auf die basale Lipogenese in Adipozyten aus dem perirenal Fettgewebe männlicher und weiblicher Ratten (n=4 für jede Gruppe) im Alter von 4,6 bzw. 12 Monaten. Abb. 3.12a und 3.12c zeigen die absoluten Werte der Lipogenese, Abb. 3.12b und 3.12d die relativen Effekte der Nukleotide, bezogen auf die korrespondierenden Kontrollansätze. \*, Unterschiede zu den Kontrollen sind signifikant, Student's t-Test,  $p < 0,05$ .

### **3.3 Die Wirkungen extrazellulärer Nukleotide auf die Lipogenese in insulinstimulierten Adipozyten in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Fettdepot**

Insulin als wichtigstes anaboles Hormon im Glukosestoffwechsel der Fettzelle hat sehr viele Aufgaben: zum einen die Stimulierung des Glukosetransports in die Adipozyten, zum anderen aber auch die Regulation von Enzymen, die an der Glykolyse und der Lipogenese beteiligt sind. Deshalb wurde untersucht, ob die lipogenesestimulierende Wirkung von Insulin durch extrazelluläre Nukleotide modifiziert wird.

Die Untersuchungen erfolgten parallel zu den Experimenten zur basalen Lipogenese. Insulin wurde 10nM eingesetzt, allein oder zusammen mit einem der Nukleotide  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP oder  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP, die jeweils 50 $\mu$ M verwendet wurden (Abb. 3.13 und 3.14).

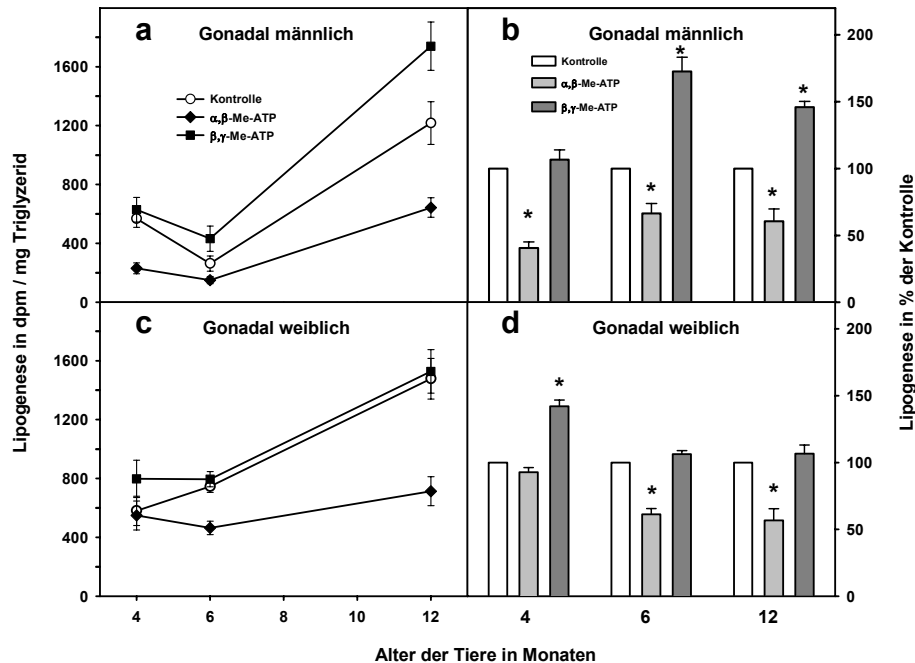
#### **3.3.1 Die Wirkung von Insulin auf die basale Lipogenese in Adipozyten von Ratten verschiedenen Alters und Geschlechts**

In den Zellen aus den Depots männlicher Tiere kann Insulin die Lipogenese um das Zwei- bis Vierfache gegenüber den Basalwerten steigern. Bei jungen, weiblichen Tieren ist die Stimulierung vor allem im gonadalen Fettgewebe deutlich stärker (siebenfach). Mit Zunahme des Alters fällt die Potenz des Insulins, die Lipogenese im weiblichen Fettgewebe zu stimulieren, in beiden Fettdepots auf den Faktor 2 ab, so dass der in jungen Tieren zu beobachtende Geschlechtsunterschied verloren geht. (Vgl. Abb. 3.11a,c mit 3.13a,c und 3.12a,c mit 3.14a,c).

#### **3.3.2 Die Wirkungen der Nukleotide auf die Lipogenese in insulinstimulierten Adipozyten von männlichen Ratten**

$\alpha,\beta$ -Methylen-ATP hemmt in beiden Geweben und allen Altersklassen der männlichen Tiere die Lipogenese in insulinstimulierten Adipozyten.

$\beta,\gamma$ -Methylen-ATP stimuliert zusätzlich zum Insulin im relativen Vergleich zur Insulinkontrolle. Der Effekt ist nicht im gonadalen Fettgewebe der 4 Monate alten Ratten nachzuweisen (Abb. 3.13b und 3.14b).



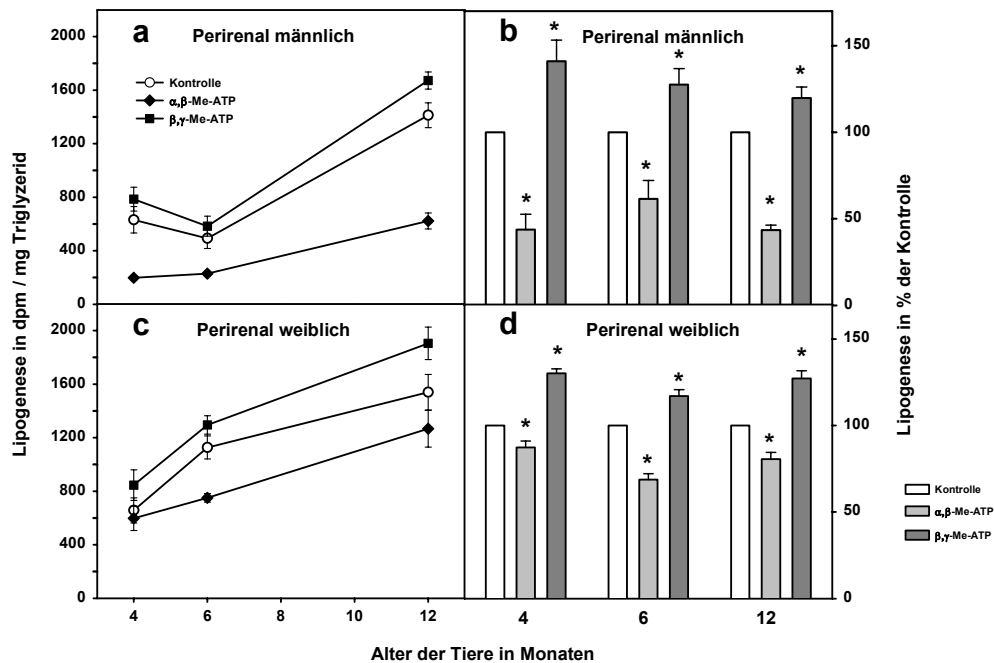
**Abb. 3.13 Die Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der Wirkungen von Nukleotiden auf die Lipogenese in insulinstimulierten, gonadalen Adipozyten.**

Dargestellt sind die Nukleotid-Effekte auf die Lipogenese in insulinstimulierten Adipozyten aus dem gonadalen Fettgewebe männlicher und weiblicher Ratten im Alter von 4,6 bzw. 12 Monaten. Die Zugabe des Insulins erfolgte dabei zeitgleich mit der Zugabe der Nukleotide. Abb. 3.13a und 3.13c zeigen die absoluten Werte der Lipogenese, Abb. 3.13b und 3.13d die relativen Effekte der Nukleotide, bezogen auf die korrespondierenden Kontrollansätze (n=4 für jede Gruppe). \*, Unterschiede zu den Kontrollen sind signifikant, Student's t-Test,  $p < 0,05$ .

### 3.3.3 Die Wirkungen der Nukleotide auf die Lipogenese in insulinstimulierten Adipozyten von weiblichen Tieren

Eine hemmende Wirkung des synthetischen  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP auf den Insulineffekt setzt bei weiblichen Tieren im gonadalen Fettgewebe erst in Adipozyten von älteren Ratten signifikant ein. Die Inhibition der Lipogenese im perirenal Gewebe ist in allen Altersklassen vorhanden.

$\beta,\gamma$ -Methylen-ATP stimuliert zusätzlich zu Insulin im perirenal Gewebe. Die Stimulierung im gonadalen Fettgewebe geht bei weiblichen Ratten nach dem 4. Monat verloren (Abb. 3.13d und 3.14d).



**Abb. 3.14 Die Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der Wirkungen von Nukleotiden auf die Lipogenese in insulinstimulierten, perirenal Adipozyten.**

Dargestellt sind die Nukleotid-Effekte auf die Lipogenese in insulinstimulierten Adipozyten aus dem perirenal Fettgewebe männlicher und weiblicher Ratten im Alter von 4,6 bzw. 12 Monaten. Die Zugabe des Insulins erfolgte dabei zeitgleich mit der Zugabe der Nukleotide. Abb. 3.14a und 3.14c zeigen die absoluten Werte der Lipogenese, Abb. 3.14b und 3.14d die relativen Effekte der Nukleotide, bezogen auf die korrespondierenden Kontrollansätze (n=4 für jede Gruppe). \*, Unterschiede zu den Kontrollen sind signifikant, Student's t-Test,  $p < 0,05$ .

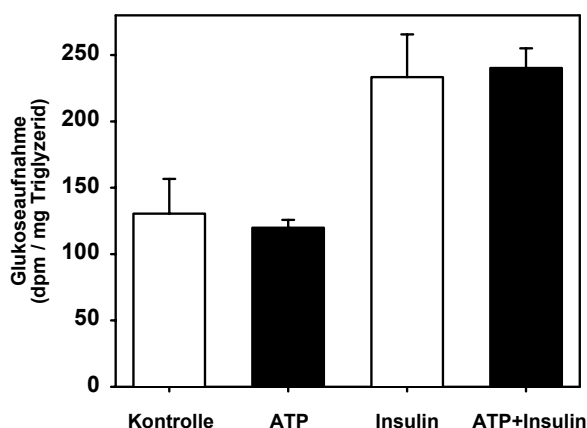
### 3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Wirkung extrazellulärer Nukleotide auf die Lipogenese in insulinstimulierten Zellen

Für das gonadale Fettgewebe lässt sich feststellen, dass es einen geschlechtsabhängigen Verlauf der Nukleotidwirkungen auf die insulinstimulierte Lipogenese gibt. Bei männlichen Tieren nimmt mit zunehmendem Alter der stimulierende Einfluß des  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP zu; die Hemmung durch  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP verringert sich. Im Gegensatz dazu nimmt die hemmende Wirkung des  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP in weiblichen Tieren mit zunehmenden Alter zu und die Stimulierung durch  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP verringert sich (Abb. 3.13b,d).

Im perirenal Fettgewebe ist grundsätzlich die zusätzliche Stimulierung der insulinstimulierten Lipogenese durch  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP in allen Altersgruppen und beiden Geschlechtern möglich. Die Hemmung durch  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP ist bei männlichen Tieren in größerem Umfang möglich (Abb. 3.14b,d).

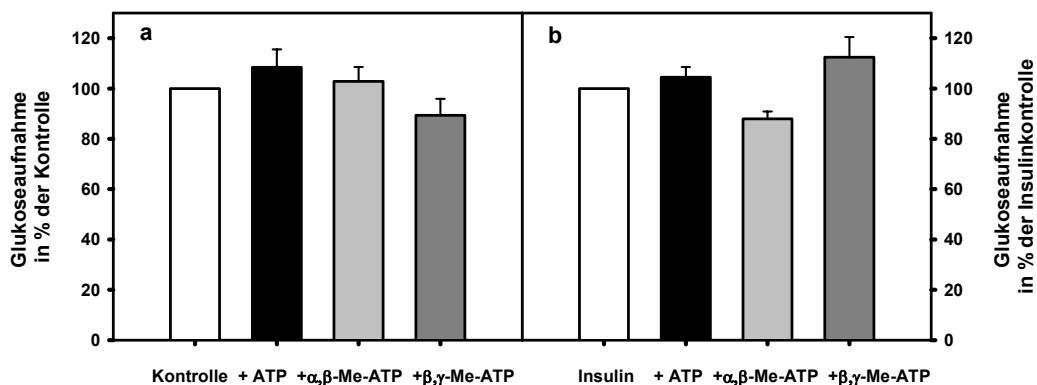
### 3.4 ATP, $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP zeigen keine Wirkung auf den basalen und den insulinstimulierten Glukosetransport

ATP und die synthetischen P2-Rezeptor-Liganden  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP haben keinen Effekt auf den basalen Glukosetransport in isolierte Adipozyten. Auch zeigen alle drei getesteten Substanzen keine Wirkung auf den insulinstimulierten Glukosetransport in die Zellen (Abb. 3.15 und 3.16).



**Abb. 3.15 ATP hat keine Wirkung auf den basalen und insulinstimulierten Glukosetransport in die Fettzelle.**

Gemessen wurde die Aufnahme von Deoxy-2-6- $^3\text{H}$ -D-Glukose in frisch isolierte Adipozyten. Die Zellen wurden 15 Minuten vor Zugabe der radioaktiven Deoxyglukose mit 50  $\mu\text{M}$  ATP und/oder 2 nM Insulin inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Experimenten in jeweils vierfachen Ansätzen.



**Abb. 3.16 ATP,  $\alpha,\beta$ -Me-ATP und  $\beta,\gamma$ -Me-ATP beeinflussen den Glukosetransport nicht.**

Die Zellen wurden wie in der Legende zu Abb. 3.15 beschrieben mit den Nukleotiden in Abwesenheit (3.16a) und Anwesenheit (3.16b) von 2nM Insulin inkubiert. Gezeigt sind die relativen Wirkungen der Nukleotide auf den basalen (3.16a) bzw. den insulinstimulierten (3.16b) Glukosetransport als Mittelwerte $\pm$ SD aus zwei Experimenten in vierfachen Ansätzen.

## 4 Diskussion

Effekte extrazellulärer Nukleotide, die über die Aktivierung von P2-Rezeptoren in die Zellen vermittelt werden, sind bereits bei einer Vielzahl von Zellen der meisten Organsysteme nachgewiesen worden (RALEVIC und BURNSTOCK, 1998; ILLES et al. 2000). Die Charakterisierung dieser Rezeptoren erfolgte durch die Bestimmung ihrer pharmakologischen Profile und ihrer molekularen Struktur. Zunächst wurde nach pharmakologischen Kriterien in verschiedene Subtypen, wie P2X, P2Z, P2T oder P2U unterteilt. Dann führten die Aufklärung der molekularen Struktur und die Entdeckung der Beteiligung zweier eigener Signaltransduktionsmechanismen zur Einteilung in die Rezeptorfamilien P2X und P2Y.

Die Arbeiten zur Induktion der Aromatase und zur Freisetzung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  in Präadipozyten durch extrazelluläre Nukleotide beschreiben die Existenz eines Präadipozyten-P2-Rezeptors im weißen Fettgewebe (SCHMIDT und LÖFFLER, 1998). Der Aromataseinduktionstest, der bei diesen Experimenten zur Charakterisierung herangezogen wurde, ist jedoch für eine Untersuchung ausgereifter Fettzellen hinsichtlich der P2-Rezeptoren nicht geeignet, da reife Adipozyten eine sehr geringe Aromataseaktivität aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden infolgedessen die Wirkungen von extrazellulären Nukleotiden auf zwei Stoffwechselwege untersucht, die für die Fettzelle und das Fettgewebe von Ratten bedeutsam sind: der Glukosetransport in die Fettzelle und die de novo Lipogenese aus Glukose. Dabei haben sich die Tests von Moody (MOODY et al., 1974) für die Lipogenese und Müller (MÜLLER et al., 1996) für den Glukosetransport als geeignete experimentelle Ansätze zur Untersuchung einer möglichst großen Probenzahl erwiesen. Die Tests kamen modifiziert zum Einsatz. Durch Vorexperimente wurde die Inkubationszeit der Zellen mit den Agonisten optimiert, so dass maximale Effekte der Nukleotide auf basale und insulinstimulierte Stoffwechselwege gemessen werden konnten.

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Untersuchungen zeigen, dass natürliche und synthetische extrazelluläre Nukleotide über mindestens zwei Adipozyten-P2-Rezeptoren die Regulation der Lipogenese in Adipozyten aus männlichen und weiblichen Ratten beeinflussen. Der Glukosetransport in die frisch isolierten

Adipozyten wird nicht von extrazellulären Nukleotiden reguliert. Dies ist die erste Arbeit, die die Wirkung extrazellulärer Nukleotide über P2-Rezeptoren auf den Glukosemetabolismus in weißen Adipozyten der Ratte beschreibt.

#### **4.1 Zwei Tests sind zur Messung der Lipogenese in frisch isolierten Adipozyten von Wistar-Ratten geeignet**

Die Frage nach geeigneten Tests für die Messung der Wirkungen extrazellulärer Nukleotide auf die Lipogenese stand am Anfang der Untersuchungen. Durch die Auftrennung der Lipide in der Dünnschichtchromatographie kann der Effekt des ATP auf die Lipogenese gezeigt werden. Die Dünnschichtchromatographie bestätigt den Einbau des Tritiums hauptsächlich in Triglyzeride (Abb. 3.1). Die Markierung der 3- $[^3\text{H}]$ -D-Glukose am C3-Atom führt dazu, dass das Tritium zum größten Teil im Hexosemonophosphatweg auf das Reduktionsäquivalent  $\text{NADP}^+$  übertragen wird, das folglich für die Reduktionsreaktionen der Fettsäuresynthese zur Verfügung steht (KATZ und ROGNSTAD, 1966).

Zur Erfassung einer größeren Probenzahl erweist sich allerdings der Lipogenese-Test nach Moody als weitaus zweckmäßiger. Moody bestätigt in seiner Arbeit den Einbau des Tritiums zu 95% in Triglyzeride (MOODY et al., 1974). Ein Teil der Radioaktivität gelangt über das  $\alpha$ -Glyzerophosphat in den Glyzerinanteil der Triglyzeride. Unter dem Einfluß von Insulin steigt das Verhältnis der Radioaktivität in Fettsäuren gegenüber der in Glyzerin.

Der für den größten Teil der Experimente verwendete Lipogenesetest ist demnach geeignet, den Einbau von Tritium aus Glukose in Triglyzeride zu messen.

#### **4.2 Der Effekt des ATP ist nicht über P1-Rezeptoren, sondern über einen Adipozyten-P2-Rezeptor vermittelt**

Der stimulierende Effekt des extrazellulären ATP auf die Lipogenese ist nicht durch seinen Abbau zu Adenosin und der folgenden Aktivierung des P1-Rezeptors  $A_1$  (VASSAUX et al., 1993) bedingt:



1. In Anwesenheit von Adenosindeaminase stimuliert ATP die Lipogenese. Die stimulierende Wirkung des Adenosins wird gehemmt (Abb. 3.2 a und b).
2. Der Effekt wurde auch in Anwesenheit von CGS15943, das alle P1-Rezeptor-Subtypen inhibiert (GHAI et al., 1987; ONGINI et al., 1999), gemessen (Abb. 3.2 c).
3. Ein nukleotidasestabiler P2-Rezeptor-Agonist ( $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP; LAMBRECHT, 2000), der nicht an P1-Rezeptoren wirkt, stimuliert die Lipogenese (Abb. 3.6).

Adenosindeaminase und CGS15943 hemmen die basale Lipogenese (Abb. 3.2). Es muss daher eine basale Stimulierung der Lipogenese durch Adenosin in den Fettzellpräparationen erfolgen. Fain und Wieser beschrieben einen hemmenden Effekt der Adenosindeaminase auf die insulinstimulierte Glukoseoxidation, die Hemmung der basalen Glukoseoxidation war nicht signifikant (FAIN und WIESER, 1975). In der gleichen Arbeit wurde eine Stimulierung der basalen Lipolyse durch Adenosindeaminase beschrieben und die Anwesenheit von Adenosin in den Präparationen angenommen. Man kann daher davon ausgehen, dass bereits in den Zellsuspensionen entweder durch Sekretion der Zellen oder durch zerstörte Zellen Adenosin in wirksamen Konzentrationen vorhanden ist (SCHWABE et al., 1973). In Gegenwart der Adenosindeaminase bzw. des P1-Rezeptorantagonisten CGS15943 kann die Aktivierung des P1-Rezeptorsystems durch freigesetztes Adenosin jedoch ausgeschlossen werden.

Die lipogenesestimulierenden Wirkungen der extrazellulären Nukleotide müssen folglich über einen eigenständigen Adipozyten-P2-Rezeptor vermittelt werden.

#### **4.3 Drei Arbeiten beschreiben ein ähnliches Ligandenprofil**

Der die Lipogenese stimulierende Adipozyten-P2-Rezeptor zeigt eine Ligandenselektivität für Adeninverbindungen.  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP, ATP, ADP und AMP wirken stimulierend, andere natürliche Nukleotide haben keinen Einfluss auf die Lipogenese.

Dieses Ligandenprofil ist ähnlich dem, das Schmidt für den Rezeptor in humanen Präadipozyten, der an der Induktion der Aromatase beteiligt ist und dessen Aktivierung zur intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation führt, beschrieben hat (SCHMIDT und LÖFFLER, 1998). Er beschreibt aber zusätzlich eine Aktivierung des P2-Rezeptors durch GTP.

Yegutkin erhielt in Studien an Adipozytenmembranen Hinweise auf Bindungsstellen für ATP, ADP, AMP und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP (YEGUTKIN und BURNSTOCK, 1999). Diese Bindungsstellen würden dem Agonistenprofil des lipogenesestimulierenden Adipozyten-P2-Rezeptors entsprechen. Yegutkin spekuliert in seiner Arbeit über die Bindung der Nukleotide an 5'-Nukleotidasen. Das würde aber nicht die Effekte der Adeninnukleotide auf die Lipogenese in Adipozyten bzw. die Induktion der Aromatase und die Mobilisation des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  erklären.

Drei unabhängige Arbeiten beschreiben demnach im weißen Fettgewebe dasselbe Ligandenprofil eines P2-Rezeptors.

In allen Arbeiten wird auch AMP als Ligand erwähnt. Dies ist insofern bemerkenswert, als bisher noch keine AMP-sensitiven P2-Rezeptoren beschrieben wurden (RALEVIC und BURNSTOCK, 1998). Die in der vorliegenden Arbeit und bei Schmidt verwendeten Zellpräparationen hatten eine geringe Ektonukleotidaseaktivität (WEISE I, persönliche Mitteilung). Zudem kann durch den Einsatz von CGS15943 die potentielle Wirkung über P1-Rezeptoren ausgeschlossen werden. AMP könnte durch seine geringe Stabilität in einigen Testsystemen als Ligand für P2-Rezeptoren übersehen werden.

#### **4.4 Es existieren mindestens zwei Adipozyten-P2-Rezeptoren**

Bisher hat keine Arbeit in einem Bioassay für Zellen des weißen Fettgewebes Hinweise auf mehr als einen P2-Rezeptor enthalten. In der vorliegenden Arbeit fällt bei der Dosiswirkungsbeziehung von ATP ein biphasischer Verlauf auf. ATP wirkt stimulierend in den Konzentrationen 5 $\mu\text{M}$  und 50 $\mu\text{M}$ . Höhere Konzentrationen führen zu schwächerer Stimulierung (Abb. 3.5 und 3.6). Darüber hinaus haben synthetische ATP-Analoga unterscheidbare Wirkungen auf die Lipogenese:  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP stimuliert -  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und 2-MeS-ATP hemmen deutlich die Lipogenese. Diese Befunde lassen sich schwer mit der Beteiligung nur eines P2-Rezeptors an der Regulation der Lipogenese in Einklang bringen.

Die hemmenden Wirkungen von  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und 2-MeS-ATP werden ebenfalls über einen eigenständigen Adipozyten-P2-Rezeptor vermittelt. Die Hypothese, dass  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP eine desensibilisierende Wirkung auf den lipogenesestimulierenden Adipozyten-P2-Rezeptor hätte, dann entweder P2X<sub>1</sub> oder P2X<sub>3</sub> (RALEVIC und

BURNSTOCK, 1998; NORTH und SURPRENANT, 2000), kann für dieses System ausgeschlossen werden:

1. Eine desensibilisierende Wirkung von  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP auf den stimulierenden Rezeptor müsste einen Wirkungsverlust der stimulierenden Agonisten ATP und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP zur Folge haben. Es lässt sich jedoch eine fast maximale Stimulierung der Lipogenese durch diese beiden Agonisten in Anwesenheit von  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP nachweisen (Abb. 3.7).
2. 2-MeS-ATP hemmt ebenfalls die Lipogenese. Eine desensibilisierende Wirkung von 2-MeS-ATP ist bisher nicht beschrieben (Abb. 3.6).
3.  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP hemmt die basale Lipogenese. Folglich müsste für eine desensibilisierende Wirkung die Stimulierung der Adipozyten durch einen Agonisten an dem lipogenesestimulierenden Adipozyten-P2-Rezeptor vorausgesetzt werden. ATP, das aus zerstörten Adipozyten stammen - oder freigesetzt werden könnte, lässt sich aber nur in niedrigen nanomolaren Konzentrationen nachweisen (WEISE I, persönliche Mitteilung). Diese Konzentrationen reichen nicht für eine Aktivierung der P2-Rezeptoren aus, die erst im mikromolaren Bereich erfolgt (NORTH und SURPRENANT, 2000).

Folglich müssen mindestens zwei Adipozyten-P2-Rezeptoren mit zwei Signaltransduktionsmechanismen an der Regulation der Lipogenese in weißen Fettzellen beteiligt sein.

#### **4.5 Die Wirkung von Antagonisten an den Adipozyten-P2-Rezeptoren**

Zur weiteren pharmakologischen Charakterisierung der Adipozyten-P2-Rezeptoren wurden Antagonisten von P2-Rezeptoren herangezogen. Die Substanzen PPADS, Reactive Blue 2 und Suramin sind als Antagonisten ohne selektive Wirkung auf P2X- oder P2Y-Reptoren in der Literatur beschrieben (CHARLTON et al., 1996; RALEVIC und BURNSTOCK, 1998). Der Mangel an subtypselektiven oder gar rezeptorspezifischen Antagonisten und die Tatsache, dass für alle genannten Substanzen Nebeneffekte beschrieben wurden, zeigen die Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse von Studien mit Antagonisten in Zellen aus nativen Geweben auf. Für alle drei Antagonisten ist die Hemmung von Ektonukleotidasen bekannt (CHEN et al., 1996;

BÜLTMANN et al., 1999), für Suramin die unspezifische Aktivierung oder Hemmung von Oberflächenrezeptoren, wie Rezeptortyrosinkinasen (RALEVIC und BURNSTOCK, 1998). Experimente mit Suramin bzw. mit seinem Analogon (NF279) zeigen bei höheren Konzentrationen (30 und 100µM) eine verstärkte Stimulierung der Lipogenese ohne Nukleotidzusatz, so dass Suramin nur bis 10µM eingesetzt werden konnte. Mit der Messung der Lipogenese können nicht die Aktivierung oder Hemmung einzelner Rezeptoren beschrieben werden, sondern nur das Endergebnis komplexer Signalmechanismen. Dementsprechend könnten Suramin und NF279 über die (In-) Aktivierung von P2-Rezeptor-unabhängigen Oberflächenrezeptoren zu diesen Ergebnissen führen.

Von den Antagonisten zeigt nur der Antagonist PPADS Wirkungen, die zum einen den lipogenesehemmenden Effekt von  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und zum anderen den lipogenesestimulierenden Effekt von  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP aufheben (Abb. 3.9). Bei der lipogenesestimulierenden ATP-Konzentration von 50µM steigert PPADS ab einer Konzentration von 10µM die Lipogeneserate signifikant (Abb. 3.8). Diese Konzentration liegt in einem Bereich, in dem PPADS keine - oder eine nur sehr geringe Hemmung von Ektonukleotidasen zeigt (LAMBRECHT, 2000).

Aus den Ergebnissen lässt sich folgern, dass entweder PPADS den inhibierenden Adipozyten-P2-Rezeptor kompetitiv effizienter hemmt als den stimulierenden, oder es den hemmenden und den stimulierenden Adipozyten-P2-Rezeptor in gleicher Weise hemmt. ATP müsste dann über einen dritten Rezeptor stimulierend wirken. Die bisherigen Resultate unterstützen nur die erste Hypothese. Allerdings wurde - ohne Daten zu zeigen - im braunen Fettgewebe bereits die Existenz von vier P2-Rezeptoren postuliert (WILSON et al., 2000).

Nicht zuletzt kann mit dem Einsatz des Antagonisten PPADS bewiesen werden, dass in den Zellpräparationen ATP nicht in wirksamen Konzentrationen vorhanden ist, weil die basale Lipogenese bei steigender PPADS Konzentration keine Veränderung zeigt.

#### **4.6 Versuch einer Zuordnung der Adipozyten-P2-Rezeptoren anhand ihrer pharmakologischen Profile gegenüber bekannten P2-Rezeptoren**

Die Unwirksamkeit von ATP<sub>γ</sub>S auf die Lipogenese schließt die Beteiligung der Rezeptoren P2X<sub>2</sub> und P2X<sub>4</sub> weitgehend aus (Abb. 3.4; RALEVIC und BURNSTOCK, 1998).

UTP gilt als wirksamer Agonist an den Rezeptoren P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> und P2Y<sub>6</sub> (VON KÜGELGEN und WETTER, 2000). Es hat aber keine Wirkung auf die Lipogenese in Adipozyten (Abb. 3.3). Diese Rezeptoren sind als potentielle Bindungsstellen zur Regulation der Lipogenese ebenfalls auszunehmen.

##### **4.6.1 Der lipogenesehemmende Adipozyten-P2-Rezeptor**

Die hemmenden Nukleotide (2-MeS-ATP<sub>≥α,β</sub>-Methylen-ATP>ATP) werden zusammen als Agonisten an den P2X-Rezeptoren P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> und dem heterodimeren Rezeptor P2X<sub>2/3</sub> beschrieben (JACOBSON und KNUTSEN, 2000; KHAKH et al., 2001). Der P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> selektive Agonist α,β-Methylen-ATP ist an diesen Rezeptoren schnell desensibilisierend wirksam. Die Rezeptoren P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub> und P2X<sub>3</sub> sind sensitiv gegenüber dem Antagonismus von PPADS und Suramin (KHAKH et al., 2001).

Bisher ist nur der Nachweis des P2X<sub>1</sub>-Rezeptors in Adipozyten aus dem Fettgewebe von Ratten gelungen (Schmidt M, persönliche Mitteilung). Zudem wurden bei elektrophysiologischen Messungen an einzelnen weißen Fettzellen mit extrazellulärem ATP Ionenströme beschrieben (LEE und PAPPONE, 1997b).

An diesem Rezeptor wurde aber auch die Wirkung von β,γ-Methylen-ATP (EC<sub>50</sub> 10μM) nachgewiesen, das in der vorliegenden Arbeit stimulierend und damit antagonistisch gegenüber α,β-Methylen-ATP wirkt. Allerdings zeigt β,γ-Methylen-ATP am P2X<sub>3</sub>-Rezeptor erst bei weitaus höheren Konzentrationen Wirksamkeit (North und Surprenant, 2000). 2-Me-SATP ist weiterhin als Agonist an allen klonierten und heterolog exprimierten P2Y-Rezeptoren wirksam, α,β-Methylen-ATP dagegen an keinem.

Der hemmende Rezeptor weist also am ehesten ein dem P2X<sub>1</sub>- bzw. P2X<sub>3</sub>-Rezeptor entsprechendes Profil auf.

#### 4.6.2 Der lipogenesestimulierende Adipozyten-P2-Rezeptor

Das Profil des stimulierenden Rezeptors ( $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP > ATP > AMP > ADP) kann dem bereits bekannten Agonistenprofil aus den Arbeiten von Schmidt zugeordnet werden.  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP ist nur als Agonist am heterolog exprimierten P2X<sub>1</sub>-Rezeptor bekannt (NORTH und SURPRENANT, 2000; LAMBRECHT, 2000).

Der P2X<sub>1</sub>-Rezeptor ist im weißen Fettgewebe vorhanden (SCHMIDT M, persönliche Mitteilung). PPADS ist gegenüber  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP ebenfalls hemmend wirksam. Demgegenüber sprechen die fehlende Wirkung von Suramin und die bekannte desensibilisierende Wirkung von  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP an dem P2X<sub>1</sub>-Rezeptor gegen seine Beteiligung als stimulierender Rezeptor.

#### 4.6.3 Die Wirkungen der extrazellulären Nukleotide müssen über die Aktivierung mindestens eines P2Y-Rezeptors vermittelt werden

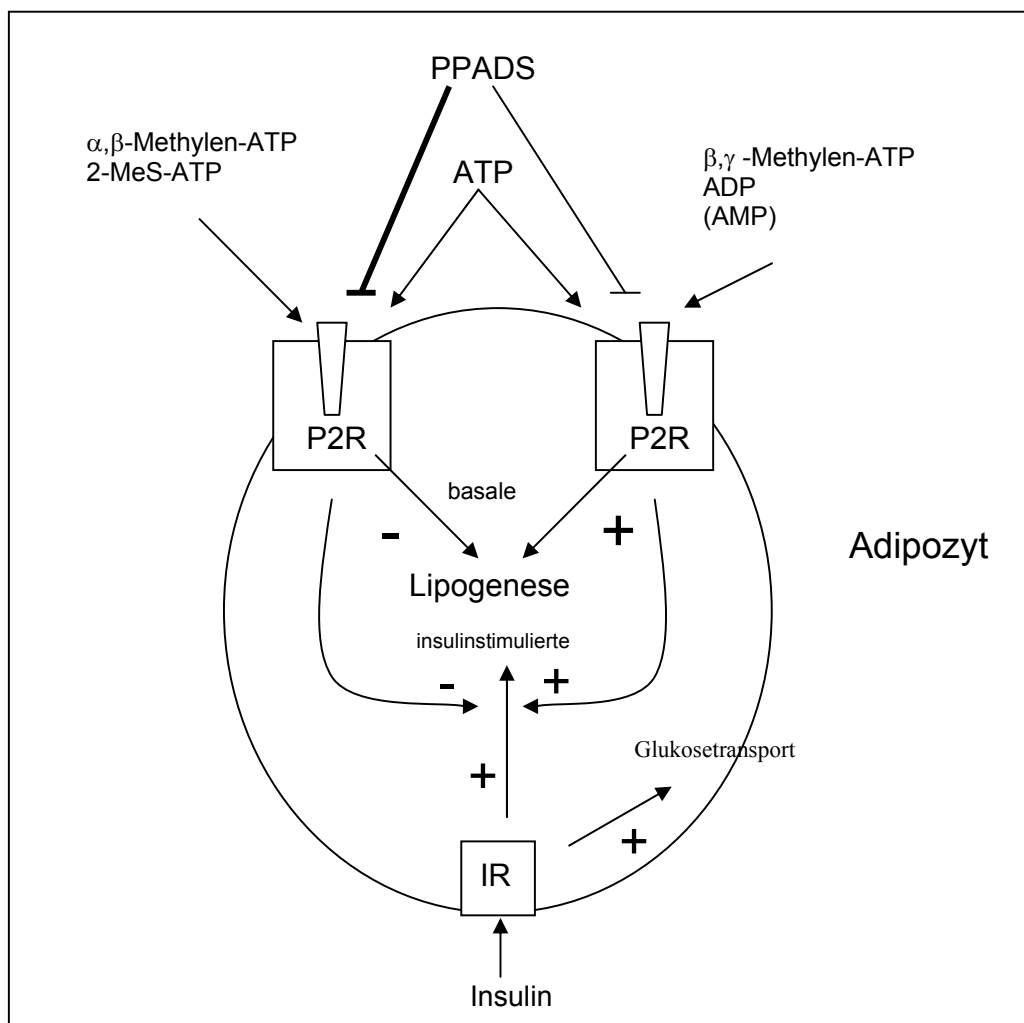
Die divergenten Wirkungen der zwei Adipozyten-P2-Rezeptoren sprechen gegen die Vermittlung ihrer Signale über zwei P2X-Rezeptoren. Diese sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die eine kationenselektive Permeabilität in der Zellmembran ermöglichen (KHA KH et al., 2001). Beispielsweise sollte der Einstrom von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> nicht zu zwei gegensätzlichen Zellreaktionen führen. Wahrscheinlich ist also die Mitwirkung mindestens eines P2Y-Rezeptors an der Regulation der Lipogenese.

Die Agonisten 2-MeS-ATP, ATP und ADP können auch an den Rezeptoren P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>11</sub> und P2Y<sub>12</sub> binden. P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> wirken u.a. über die Inaktivierung, P2Y<sub>11</sub> über die Aktivierung der Adenylatcyclase (VON KÜGELGEN und WETTER, 2000; HOLLOPETER et al., 2001). Das intrazelluläre Signalmolekül cAMP spielt bei der Transduktion des Insulinsignals eine große Rolle: die insulinstimulierte Aktivierung der Phosphodiesterase führt zur Erniedrigung von cAMP. Die lipogenesestimulierenden Nukleotide könnten demnach auch über die Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> wirken; eine Hemmung der Lipogenese könnte über den Rezeptor P2Y<sub>11</sub> erfolgen.

Die extrazellulären Nukleotide wirken auch in Gegenwart von Insulin. Ihre Signale werden demnach effektiv im basalen und insulinstimulierten Zustand der Zellen weitergeleitet. Der stimulierende Rezeptor muss einen Signalweg aktivieren, der zumindest anfänglich differierend von dem des Insulins ist. Dies wird auch unter dem

Aspekt verständlich, dass Insulin im Gegensatz zu  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP den Glukosetransport in die Zellen stimuliert. Dadurch steht bereits mehr Substrat für die Lipogenese zur Verfügung, und diese wird durch entstehende Metabolite aktiviert. Zusätzlich reguliert Insulin die Genexpression und die Aktivität lipogenetischer Enzyme. Diese unterschiedlichen Mechanismen sind für die langfristige (Genexpression) und kurzfristige (Aktivierung von Enzymen) Stimulierung der Lipogenese wichtig.

Die Nukleotide ändern nichts an der Glukosekonzentration in den Zellen und können so nicht über diesen Weg die Lipogenese beeinflussen. Die Adipozyten-P2-Rezeptoren müssen demzufolge Signalwege aktivieren, die den Glukosemetabolismus in der Fettzelle beeinflussen.



**Abb.1 Modell der P2-Rezeptoren in Adipozyten und ihrer Wirkungen auf die basale und insulinstimulierte Lipogenese.** IR – Insulinrezeptor, P2R – P2-Rezeptor. PPADS hemmt beide Rezeptoren.

#### **4.7 Die Wirkungen der extrazellulären Nukleotide über die Adipozyten-P2-Rezeptoren sind bei beiden Geschlechtern alters- und depotabhängig nachweisbar**

Stoffwechselwege, die einer hormonellen Regulation unterworfen sind, weisen alters- und geschlechtsabhängige Unterschiede auf. Bisherige in vitro Untersuchungen an Adipozyten von männlichen Ratten ergaben keine Änderungen des basalen Transports und der basalen Lipogeneserate im weißen Fettgewebe mit zunehmenden Alter. Jedoch fiel eine starke Abnahme des insulinstimulierten Metabolismus, d.h. des Glukosetransports, der Glukoseoxidation und der Triglyzeridsynthese auf (FINK et al., 1986). Weiterhin wurde die altersgebundene Abnahme der Expression des Gens der Fettsäuresynthase geschildert (NOGALSKA und SWIERCZYNSKI, 2001). Die Aktivität dieses Enzyms und die Altersabhängigkeit des Glukosetransports wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, jedoch ist in den Ergebnissen aus den Versuchen mit Wistar-Ratten ein Anstieg der basalen Lipogenese mit Zunahme des Alters der Tiere von vier auf zwölf Monate zu beobachten (Abb. 3.11a und 3.12a). Die kurzfristige Abnahme der Lipogenese bei männlichen Tieren im Alter von 6 Monaten ist nicht durch einen Fehler des verwendeten Tests verursacht. Die Abnahme zeigt sich bei allen Einzelexperimenten zur Bestimmung der basalen wie der insulinstimulierten Lipogenese. Die Effekte der synthetischen Nukleotide sind wie in den beiden anderen Altersgruppen messbar. Ein Abfall der Lipogeneserate bis zum 6. Lebensmonat von Wistar Ratten ist bereits beschrieben worden (PETRASEK et al., 1978). Nur wird dann im weiteren Altersverlauf keine Änderung der Lipogenese beschrieben. Bei den eigenen Versuchen ist eine Zunahme messbar. In dieser Hinsicht besteht also keine Übereinstimmung mit den beschriebenen Veröffentlichungen.

Die Hemmung der Lipolyse durch Insulin nimmt mit Zunahme des Alters der Ratten ebenfalls ab (REAVEN et al., 1989). Reaven erklärte dies mit einer Abnahme der Insulinsensitivität. Er betont in seiner Arbeit auch die Rolle der Adenosinrezeptoren in der Regulation von Glukosetransport und Lipolyse, da sie bei älteren Tieren mehr Einfluss auf diese nahmen als bei jüngeren. Eine Reduktion des Insulineinflusses ließ sich in den Adipozyten zumindest in den weiblichen Tieren nachweisen.

Veröffentlichungen, die sich speziell mit Unterschieden in der Lipogenese in Adipozyten beider Geschlechter befassen, sind nicht bekannt.



Der unterschiedlichen Entwicklung von Nukleotidwirkungen auf die basale Lipogenese in Adipozyten männlicher (altersunabhängige Stimulierung durch  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP) und weiblicher Tiere (Stimulierung durch  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP v.a. bei jungen Tieren) steht die generell hemmende Wirkung des  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP bei beiden Geschlechtern gegenüber (Abb. 3.11b,d und 3.12b,d). Die insulinstimulierte Lipogenese wird vor allem im männlichen Fettgewebe durch  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP gehemmt. Nur im gonadalen Fettgewebe der weiblichen Tiere erlangt  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP eine mit dem Alter zunehmend wachsende Rolle (Abb. 3.13 und 3.14).

Einzig bei den Effekten der Nukleotide auf die insulinstimulierte Lipogenese lassen sich neben den beschriebenen Unterschieden zwischen den Geschlechtern auch Abweichungen zwischen den Depots feststellen. Im perirenenalen Fettgewebe zeigen sich altersunabhängige Effekte aller Agonisten. Dagegen sind im gonadalen Fettgewebe für die insulinstimulierte Lipogenese analog zur basalen Lipogenese gegenläufige, altersabhängige Effekte des  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP messbar.

In der vorliegenden Arbeit sind Unterschiede zwischen zwei viszeralen Fettdepots untersucht worden. Dies hat zwei Gründe:

1. Aus dem subkutanen Fettgewebe der Ratten lassen sich ausreichende Mengen intakter Adipozyten nur mit einer ungleich höheren Anzahl an Tieren isolieren.
2. Viszerale Depots haben im Gegensatz zum subkutanen Fettgewebe eine höhere metabolische Aktivität (ARNER, 1995), und sind so auch im Hinblick auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Situation im Menschen von größerem Interesse.

#### **4.8 Adipozyten-P2-Rezeptoren nehmen nicht an der Regulation des Glukosetransports in die Fettzelle teil**

Eine hemmende Wirkung extrazellulärer Nukleotide über einen P2-Rezeptor auf den Glukosetransport in Herzmuskelzellen wurde von Fischer beschrieben (FISCHER et al., 1999). Hier wurde als Korrelat dieser Hemmung eine verminderte Anzahl von Glukosetransportern (GLUT1 und GLUT4) in den Zellmembranen gemessen. In

Skelettmuskelzellen stimulieren ATP und andere Nukleotide die Rekrutierung von GLUT1 und GLUT4 und die Aufnahme von D-[2,6-<sup>3</sup>H]-Deoxyglukose (KIM et al., 2002). In den vorliegenden Untersuchungen beeinflussen extrazelluläres ATP und die getesteten synthetischen Nukleotide den basalen oder den insulinstimulierten Glukosetransport in frisch isolierte Adipozyten nicht (Abb. 3.15 und 3.16). Die Ergebnisse decken sich mit denen von drei Arbeitsgruppen (CHANG und CUATRECASAS, 1974; LOTEN et al., 1976; HASHIMOTO et al., 1987), die übereinstimmen, dass extrazelluläres ATP keine Wirkung auf den basalen Glukosetransport hat. Allerdings hat in diesen Arbeiten extrazelluläres ATP einen hemmenden Einfluss auf die insulinstimulierte Aufnahme von 3-O-Methylglukose (Hashimoto, Chang) bzw. D-Allose (Loten) in die Fettzellen. In den eigenen Untersuchungen wurde die Aufnahme von D-[2,6-<sup>3</sup>H]-Deoxyglukose gemessen. Der Unterschied zu den hier dargestellten Ergebnissen könnte mit den unterschiedlichen Substraten für die Transportmessung in Zusammenhang stehen. Außerdem untersuchten alle drei Arbeitsgruppen Adipozyten von Sprague-Dawley-Ratten und nicht von Wistar-Ratten wie die vorliegende Arbeit. Differenzen bestehen auch in der verwendeten ATP-Konzentration. Hashimoto setzte in seinen Experimenten millimolare Konzentrationen von ATP ein, welche deutlich über den, für die Stimulierung von P2-Rezeptoren nötigen Konzentrationen liegen. In den vorliegenden Untersuchungen stimulieren 50µM ATP und  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP die Lipogenese. 50µM  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP hemmen die Lipogenese. Diese Konzentration wurde auch bei der Messung des Glukosetransports in die Adipozyten verwendet. Weder ATP noch die beiden getesteten, synthetischen Nukleotide  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP und  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP, die eindeutige Wirkungen auf die Lipogenese haben, beeinflussen die Glukoseaufnahme. Wenn die Nukleotide in dieser Konzentration nicht den Glukosetransport regulieren, müssen sie auf Enzyme wirken, die an der Lipogenese beteiligt sind, z.B. Acetyl-CoA-Carboxylase, Fettsäuresynthase u.a. Dieser Befund unterscheidet das Adipozyten-P2-Rezeptor-System von anderen Signalsystemen im Fettgewebe, wie das der Adrenorezeptoren, des Insulinrezeptors oder der Adenosinrezeptoren, die alle an der Regulation des Glukosetransports beteiligt sind.

#### **4.9 Vergleich der Wirkungsweise des Adipozyten-P2-Rezeptorsystems mit der des Adrenorezeptorensystems auf die Lipogenese im Fettgewebe**

Die Ergebnisse zeigen, dass ein komplexes System mit unterschiedlichen Affinitäten der Nukleotide als Liganden zu den Rezeptoren verantwortlich für Stimulierung oder Inhibierung der Lipogenese in Adipozyten ist.

Ein ähnliches Regulationssystem ist das der Katecholaminrezeptoren in den Adipozyten. Die Aktivierung von  $\alpha_2$ -Rezeptoren bzw.  $\beta$ -Rezeptoren bewirkt über die Regulation der cAMP-Konzentration in den Adipozyten eine Hemmung bzw. Stimulierung v.a. der Lipolyse, doch wird die Lipogenese zusätzlich über die Aktivierung der Proteinkinase A mitreguliert (LAFONTAN und BERLAN, 1993; VALET et al., 2000). In Anlehnung an dieses Rezeptormodell und eingedenk der Tatsache, dass Nukleotide als Kotransmitter im sympathischen Nervensystem anerkannt sind (BURNSTOCK, 1990; WESTFALL, 1990; BURNSTOCK, 1999; BODIN und BURNSTOCK, 2001), könnte man für die Regulation der Lipogenese über P2-Rezeptoren ein ähnliches System vorschlagen, das nach der unterschiedlich ausgeprägten Konfiguration der beteiligten Rezeptoren auf der Fettzelloberfläche die Lipogenese beeinflusst. Wie erwähnt, besteht ein Unterschied in der Regulation des Glukosetransports.

#### **4.10 Die Adipozyten-P2-Rezeptoren als Ursache von Krankheiten des Fettgewebes**

In dieser Arbeit werden Veränderungen in den Wirkungen der extrazellulären Nukleotide in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht beschrieben. Beispielsweise nimmt im weiblichen, gonadalen Fettgewebe der Einfluss des hemmenden  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP auf die insulinstimulierte Lipogenese zu. Der stimulierende Agonist  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP verliert seine Wirkung mit zunehmenden Alter (Abb. 3.13d). Haben extrazelluläre Nukleotide physiologisch in jüngeren Jahren einen zusätzlich zum Insulin stimulierenden Effekt, so wirken sie bei älteren Tieren antagonistisch. Dies wäre eine Erklärungsmöglichkeit für die im Alter entstehende Insulinresistenz, die nicht nur durch Insuffizienz des Insulinsignalsystems getriggert würde, sondern zusätzlich durch Veränderungen in anderen Signalsystemen, wie z.B. dem Adipozyten-P2-Rezeptorsystem.

Pathologische Relevanz des P2-Rezeptor-Systems in Adipozyten würde auch dann erlangt werden, wenn einer der beiden vorgestellten Signalwege in den Zellen entweder nicht vorhanden oder nicht adäquat ausgeprägt sein würde. Eine vermehrte Wirksamkeit des lipogenesestimulierenden Rezeptors könnte der Insulinresistenz entgegenwirken. Im Maus-Tiermodell schützt die Überexpression des A<sub>1</sub>-Rezeptors die adipösen Tiere vor der Insulinresistenz (DONG et al., 2001). Eine abnormal hohe Aktivität des stimulierenden P2-Rezeptors hätte aber die ständige Aktivierung der Lipogenese zur Folge und könnte so zur Adipositas führen. Eine rezessive Mutation im Gen für den P1-Rezeptor A<sub>1</sub>, die diesen Rezeptor tonisch aktiv wirken lässt, wird im Zusammenhang mit Adipositas von genetisch fettsüchtigen Zucker Ratten und ob/ob Mäusen beschrieben (LANOUE und MARTIN 1994). Dieser Signalweg hemmt die Lipolyse und erhöht die Insulinsensitivität im Fettgewebe.

Ein kompletter Ausfall des hemmenden Rezeptorsystems, z. B. durch genetische Defekte des Rezeptorgens, könnte ebenfalls zur Adipositas und deren Folgeerkrankungen führen, wenn eine hormonelle Gegensteuerung durch andere hemmende Transmitter nicht ausreicht, das Gleichgewicht im Glukose- und Lipidstoffwechsel der Fettzelle wiederherzustellen.

Das Adipozyten-P2-Rezeptorsystem trägt zusammen mit anderen Signalsystemen zur Feinregulierung des Glukosemetabolismus in Fettzellen von Ratten bei. Die zukünftige Forschung an P2-Rezeptoren in Adipozyten muss zum Ziel haben, die Mechanismen der beteiligten Signalübertragungswege aufzuklären und die Rezeptoren mit Nachweis der Gensequenzen molekularbiologisch zu charakterisieren. Trotz der Unterschiede zwischen der Lipogeneseaktivität im Fettgewebe zwischen Menschen und Nagetieren wäre die Untersuchung menschlicher Adipozyten auf P2-Rezeptoren von großem Interesse. Die endokrinologischen Störungen bei Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 sind nicht bis ins Detail aufgeklärt. Vielleicht spielt das Adipozyten-P2-Rezeptorsystem neben den bereits beschriebenen Transmittern bei der Pathogenese dieser Volkskrankheiten eine grundlegende Rolle.

## 5 Schlussfolgerungen

Die Verwendung der neu etablierten Tests zur Messung der Lipogenese und des Glukosetransports in weiße Fettzellen ermöglichte die Charakterisierung zweier Adipozyten-P2-Rezeptoren. Über diese Rezeptoren wirken extrazelluläre Nukleotide stimulierend bzw. hemmend auf die Lipogenese in weißen Fettzellen von Wistar-Ratten.

Im Hinblick auf die altersabhängigen Veränderungen der Nukleotidwirkungen auf die insulinstimulierte Lipogenese z.B. im gonadalen Fettgewebe weiblicher Tiere scheinen P2-Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Regulation des Glukosemetabolismus in Fettzellen von Ratten zu spielen. Um ihren Wirkmechanismus auf die basale und die insulinstimulierte Lipogenese besser verstehen zu können, sollte die Aufdeckung der intrazellulären Signalwege zum nächsten Ziel zukünftiger Forschung gemacht werden. Es wäre weiterhin interessant, die beteiligten Adipozyten-P2-Rezeptoren molekularbiologisch zu charakterisieren und in das bestehende System einzuordnen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen nur Schlüsse auf das Adipozyten-P2-Rezeptorsystem von Ratten zu. Die Untersuchung humanen Fettgewebes auf die Existenz von P2-Rezeptoren und auf die mögliche physiologische Beteiligung extrazellulärer Nukleotide an der Regulation des Glukosemetabolismus wäre vor allem in Hinsicht auf die nur wenig verstandene Entwicklung der Insulinresistenz im Alter von großem Interesse. So könnten Nukleotide direkt Mediatoren der Insulinresistenz sein. Im Zusammenhang mit dem Stoffwechselweg der Lipogenese wäre eine Überaktivität des lipogenesehemmenden Adipozyten-P2-Rezeptors nicht von einer Insulinresistenz anderen Ursprungs unterscheidbar.

Bei Vorhandensein dieses Rezeptorsystems im humanen Fettgewebe wäre weiterhin die Korrelation von möglichen Polymorphismen in den Rezeptorgenen mit Adipositas, Metabolischem Syndrom oder Insulinresistenz von Bedeutung.

Schon jetzt werden Antagonisten an P2-Rezeptoren therapeutisch zur Antikoagulation genutzt. Das Ziel der Forschung könnte sein das therapeutische Potential von P2-Rezeptor-(Ant-)Agonisten in der Behandlung von Adipositas oder Insulinresistenz vor allem in Fällen, die nur einer medikamentösen Therapie zugänglich sind, zu prüfen.

## 6 Literaturverzeichnis

**Abbracchio MP and Burnstock G** (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol.Ther.* 64:445-475.

**Arner P** (1995) Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann.Med.* 27:435-438.

**Barnard EA and Simon J** (2001) An elusive receptor is finally caught: P2Y(12'), an important drug target in platelets. *Trends Pharmacol.Sci.* 22:388-391.

**Boarder MR and Hourani SM** (1998) The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. *Trends Pharmacol.Sci.* 19:99-107.

**Bodin P and Burnstock G** (2001) Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem.Res.* 26:959-969.

**Brake AJ and Julius D** (1996) Signaling by extracellular nucleotides. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 12:519-541.

**Brake AJ, Wagenbach MJ and Julius D** (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371:519-523.

**Bültmann R, Trendelenburg M, Tuluc F, Wittenburg H and Starke K** (1999) Concomitant blockade of P2X-receptors and ecto-nucleotidases by P2- receptor antagonists: functional consequences in rat vas deferens. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 359:339-344.

**Burnstock G** (1976) Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1:239-248.

**Burnstock G**: A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Bolis L und Straub RW(eds.): *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones*. Raven Press, New York (1978) S. 107-118.

**Burnstock G** (1990) The fifth Heymans memorial lecture-Ghent, February 17, 1990. Co- transmission. Arch.Int.Pharmacodyn.Ther. 304:7-33.

**Burnstock G** (1999) Purinergic cotransmission. Brain Res.Bull. 50:355-357.

**Burnstock G and Williams M** (2000) P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. J.Pharmacol.Exp.Ther. 295:862-869.

**Chang KJ and Cuatrecasas P** (1974) Adenosine triphosphate-dependent inhibition of insulin-stimulated glucose transport in fat cells. Possible role of membrane phosphorylation. J.Biol.Chem. 249:3170-3180.

**Charlton SJ, Brown CA, Weisman GA, Turner JT, Erb L and Boarder MR** (1996) PPADS and suramin as antagonists at cloned P2Y- and P2U-purinoceptors. Br.J.Pharmacol. 118:704-710.

**Chen BC, Lee CM and Lin WW** (1996) Inhibition of ecto-ATPase by PPADS, suramin and reactive blue in endothelial cells, C6 glioma cells and RAW 264.7 macrophages. Br.J.Pharmacol. 119:1628-1634.

**Chizh BA and Illes P** (2001) P2X receptors and nociception. Pharmacol.Rev.53:553-568.

**Cianflone K** (1997) Acylation stimulating protein and the adipocyte. J.Endocrinol. 155:203-206.

**Dong Q, Ginsberg HN and Erlanger BF** (2001) Overexpression of the A1 adenosine receptor in adipose tissue protects mice from obesity-related insulin resistance. Diabetes Obes.Metab 3:360-366.

**Drury AN and Szent-Györgyi A** (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. J.Physiol. (Lond) 68:213-237.

**Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA and Surprenant A (1995)**

Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol.Pharmacol.* 48:178-183.

**Fain JN and Wieser PW (1975)** Effects of adenosine deaminase on cyclic adenosine monophosphate accumulation, lipolysis and glucose metabolism of fat cells. *J.Biol.Chem.* 250:1027-1034.

**Fink RI, Huecksteadt T and Karaoghlanian Z (1986)** The effects of aging on glucose metabolism in adipocytes from Fischer rats. *Endocrinology* 118:1139-1147.

**Fischer Y, Becker C and Loken C (1999)** Purinergic inhibition of glucose transport in cardiomyocytes. *J.Biol.Chem.* 274:755-761.

**Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P and Williams M (1994)** Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol.Rev.* 46:143-156.

**Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G and Wasserman W (2000)** Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 362:364-374.

**Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ and Burrell MA (2001)** The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 280:E827-E847.

**Ghai G, Francis JE, Williams M, Dotson RA, Hopkins MF, Cote DT, Goodman FR and Zimmerman MB (1987)** Pharmacological characterization of CGS 15943A: a novel nonxanthine adenosine antagonist. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 242:784-790.

**Girard J, Perdereau D, Fougère F, Prib-Buus C and Ferré P (1994)** Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J.* 8:36-42.

**Gliemann J, Osterlind K, Vinten J and Gammeltoft S (1972)** A procedure for measurement of distribution spaces in isolated fat cells. *Biochim.Biophys.Acta* 286:1-9.



**Hacke W** (2002) From CURE to Match: ADP receptor antagonists as the treatment of choice for high-risk atherothrombotic patients. *Cerebrovasc.Dis.* 13:22-26.

**Hashimoto N, Robinson FW, Shibata Y, Flanagan JE and Kono T** (1987) Diversity in the effects of extracellular ATP and adenosine on the cellular processing and physiologic actions of insulin in rat adipocytes. *J.Biol.Chem.* 262:15026-15032.

**Haystead TA, Moore F, Cohen P and Hardie DG** (1990) Roles of the AMP-activated and cyclic-AMP-dependent protein kinases in the adrenaline-induced inactivation of acetyl-CoA carboxylase in rat adipocytes. *Eur.J.Biochem.* 187:199-205.

**Hellerstein MK** (1999) De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *Eur.J.Clin.Nutr.* 53 Suppl 1:S53-S65.

**Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D and Conley PB** (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409:202-207.

**Illes P, Klotz KN and Lohse MJ** (2000) Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 362:295-298.

**Jacobson KA and Knutsen LJS**: P1 and P2 Purine and Pyrimidine Receptor Ligands. In: Abbracchio MP and Williams M (eds): Purinergic and pyrimidinergic signalling. Springer-Verlag, Berlin (2001) S. 130-175.

**Jitrapakdee S and Wallace JC** (1999) Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem.J.* 340:1-16.

**Joost HG and Steinfeldt HJ** (1982) Modulation of insulin sensitivity by adenosine. Effects on glucose transport, lipid synthesis, and insulin receptors of the adipocyte. *Mol.Pharmacol.* 22:614-618.

**Kaartinen JM, Hreniuk SP, Martin LF, Ranta S, LaNoue KF and Ohisalo JJ** (1991) Attenuated adenosine-sensitivity and decreased adenosine-receptor number in adipocyte plasma membranes in human obesity. *Biochem.J.* 279 ( Pt 1):17-22.

**Kahn BB and Flier JS** (2000) Obesity and insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 106:473-481.

**Katz J and Rognstad R** (1966) The metabolism of tritiated glucose by rat adipose tissue. *J.Biol.Chem.* 241:3600-3610.

**Kersten S** (2001) Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2:282-286.

**Kersten S, Desvergne B and Wahli W** (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405:421-424.

**Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M and Humphrey PP** (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol.Rev.* 53:107-118.

**Kim MS, Lee J, Ha J, Kim SS, Kong Y, Cho YH, Baik HH and Kang I** (2002) ATP stimulates glucose transport through activation of P2 purinergic receptors in C(2)C(12) skeletal muscle cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 401:205-214.

**Lafontan M and Berlan M** (1993) Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J.Lipid Res.* 34:1057-1091.

**Lambrecht G** (2000) Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 362:340-350.

**Lambrecht G, Friebe T, Grimm U, Windscheif U, Bungardt E, Hildebrandt C, Baumert HG, Spatz-Kumbel G and Mutschler E** (1992) PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor- mediated responses. *Eur.J.Pharmacol.* 217:217-219.

**Lange K** (2001) Regulation of glucose uptake in differentiated cells. *Front Biosci.* 6:D630-D659.

**LaNoue KF and Martin LF** (1994) Abnormal A1 adenosine receptor function in genetic obesity. *FASEB J.* 8:72-80.

**Lee SC and Pappone PA** (1997a) Effects of P2 purinergic receptor stimulation in brown adipocytes. *Am.J.Physiol* 273:C679-C686.

**Lee SC and Pappone PA** (1997b) Membrane responses to extracellular ATP in rat isolated white adipocytes. *Pflugers Arch.* 434:422-428.

**Löffler G und Petrides PE:** Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1998) S. 437.

**Loten EG, Regen DM and Park CR** (1976) Transport of D-allose by isolated fat-cells: an effect of adenosine triphosphate on insulin stimulated transport. *J.Cell Physiol* 89:651-660.

**Moody AJ, Stan MA, Stan M and Gliemann J** (1974) A simple free fat cell bioassay for insulin. *Horm.Metab Res.* 6:12-16.

**Müller G, Ertl J, Gerl M and Preibisch G** (1997) Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J.Biol.Chem.* 272:10585-10593.

**Nicholas RA** (2001) Identification of the P2Y(12) receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides. *Mol.Pharmacol.* 60:416-420.

**Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E and Schmalzing G** (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17:3016-3028.

**Nogalska A and Swierczynski J** (2001) The age-related differences in obese and fatty acid synthase gene expression in white adipose tissue of rat. *Biochim.Biophys.Acta* 1533:73-80.

**North RA and Surprenant A** (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 40:563-580.

**Omatsu-Kanbe M and Matsuura H** (1999) Inhibition of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry by extracellular ATP in rat brown adipocytes. *J.Physiol* 521 Pt 3:601-615.

**Ongini E, Dionisotti S, Gessi S, Irenius E and Fredholm BB** (1999) Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 359:7-10.

**Pappone PA and Lee SC** (1996) Purinergic receptor stimulation increases membrane trafficking in brown adipocytes. *J.Gen.Physiol* 108:393-404.

**Petrasek R, Poledne R and Novotny M** (1978) Fatty acid synthesis in vitro in the liver and adipose tissue of rats of various ages. *Physiol Bohemoslov.* 27:75-79.

**Pierce KL, Premont RT and Lefkowitz RJ** (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.* 3:639-650.

**Ralevic V and Burnstock G** (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol.Rev.* 50:413-492.

**Reaven GM, Chang H and Hoffman BB** (1989) Impaired insulin-mediated inhibition of lipolysis and glucose transport with aging. *Horm.Metab Res.* 21:168-171.

**Rodbell M** (1964) Metabolism of isolated fat cells - I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J.Biol.Chem.* 239:375-380.

**Saltiel AR and Kahn CR** (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.

**Sattin A and Rall TW** (1970) The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. *Mol.Pharmacol.* 6:13-23.

**Schmidt M and Löffler G** (1998) Induction of aromatase activity in human adipose tissue stromal cells by extracellular nucleotides--evidence for P2-purinoceptors in adipose tissue. *Eur.J.Biochem.* 252:147-154.

**Schwabe U, Ebert R and Erbler HC** (1973) Adenosine release from isolated fat cells and its significance for the effects of hormones on cyclic 3',5'-monophosphate levels and lipolysis. *Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 276:133-148.

**Stears AJ and Byrne CD** (2001) Adipocyte metabolism and the metabolic syndrome. *Diabetes Obes.Metab.* 3:129-142.

**Summers SA, Whiteman EL and Birnbaum MJ** (2000) Insulin signaling in the adipocyte. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 24 Suppl 4:S67-S70.

**Summers SA, Yin VP, Whiteman EL, Garza LA, Cho H, Tuttle RL and Birnbaum MJ** (1999) Signaling pathways mediating insulin-stimulated glucose transport. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 892:169-186.

**Swierczynski J, Goyke E, Wach L, Pankiewicz A, Kochan Z, Adamonis W, Sledzinski Z and Aleksandrowicz Z** (2000) Comparative study of the lipogenic potential of human and rat adipose tissue. *Metabolism* 49:594-599.

**Tatsis-Kotsidis I and Erlanger BF** (1999) A1 adenosine receptor of human and mouse adipose tissues: cloning, expression, and characterization. *Biochem.Pharmacol.* 58:1269-1277.

**Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A and Buell G** (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371:516-519.

**Valet P, Grujic D, Wade J, Ito M, Zingaretti MC, Soloveva V, Ross SR, Graves RA, Cinti S, Lafontan M and Lowell BB** (2000) Expression of human alpha 2-adrenergic receptors in adipose tissue of beta 3-adrenergic receptor-deficient mice promotes diet-induced obesity. *J.Biol.Chem.* 275:34797-34802.

**Van Baak MA** (2001) The peripheral sympathetic nervous system in human obesity. *Obes.Rev.* 2:3-14.

**Vassaux G, Gaillard D, Mari B, Ailhaud G and Negrel R** (1993) Differential expression of adenosine A1 and A2 receptors in preadipocytes and adipocytes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 193:1123-1130.

**Vernon RG, Barber MC and Travers MT** (1999) Present and future studies on lipogenesis in animals and human subjects. *Proc.Nutr.Soc.* 58:541-549.

**von Kügelgen, I and Wetter A** (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 362:310-323.

**Wahlefeld AW** (1974) Triglycerides - Determination after Enzymatic Hydrolysis. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, p 1831-1835.

**Westfall DP, Sedaa KO, Shinozuka K, Bjur RA and Buxton IL** (1990) ATP as a cotransmitter. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 603:300-310.

**Wilson SM and Pappone PA** (1999) P2 receptor modulation of voltage-gated potassium currents in brown adipocytes. *J.Gen.Physiol* 113:125-138.

**Wilson SM, Barsoum MJ, Wilson BW and Pappone PA** (1999) Purine nucleotides modulate proliferation of brown fat preadipocytes. *Cell Prolif.* 32:131-140.

**Wilson SM, Lee SC, Shook S and Pappone PA** (2000) ATP and beta-adrenergic stimulation enhance voltage-gated K current inactivation in brown adipocytes. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 279:C1847-C1858.

**Windscheif U** (1996) Purinoceptors: from history to recent progress. A review. *J.Pharm.Pharmacol.* 48:993-1011.

**Yegutkin GG and Burnstock G** (1999) Steady-state binding of adenine nucleotides ATP, ADP and AMP to rat liver and adipose plasma membranes. *J.Recept.Signal.Transduct.Res.* 19:437-448.

**Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman JM (1994)**

Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.

**Ziganshin AU, Hoyle CH, Bo X, Lambrecht G, Mutschler E, Baumert HG and Burnstock G (1993)** PPADS selectively antagonizes P2X-purinoreceptor-mediated responses in the rabbit urinary bladder. *Br.J.Pharmacol.* 110:1491-1495.

**Zimmermann H (2000)** Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 362:299-309.

## 7 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

2-MeS-ADP	2-Methylthio-Adenosin-5'-diphosphat
2-MeS-ATP	2-Methylthio-Adenosin-5'-triphosphat
$\alpha,\beta$ -Me-ATP	Adenosin-5'-[ $\alpha,\beta$ -methylen]triphosphat
$\beta,\gamma$ -Me-ATP	Adenosin-5'-[ $\beta,\gamma$ -methylen]triphosphat
$A_2P_4$	Diadenosintetraphosphat
ADA	Adenosindeaminase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP $_{\gamma}$ -S	Adenosin-5'-O-[3-thio]triphosphat
cAMP	3',5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
CGS 15943	9-Chloro-2-(2-furanyl)[1,2,4]triazolo- [1,5-c]quinazolin-5-amin
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Dpm	decays per minute
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
ITP	Inosin-5'-triphosphat
KRH	Krebs-Ringer-Henseleit
NAD(H/H) <sup>+</sup>	(reduziertes) Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP(H/H) <sup>+</sup>	(reduziertes) Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid- Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
PEP	Phosphoenolpyruvat
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure
RB2	Reactive Blue 2
TRAM	Triethanolamin
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat



## **8 Anhang**

### **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klinger und Herrn Dr. Schmidt für die Bereitstellung des interessanten Themas.

Besonders wertvoll war die ständige Bereitschaft zur Unterstützung und Diskussion von Herrn Dr. Schmidt.

Außerdem danke ich

der Deutschen Adipositas Gesellschaft für die Gewährung von Reisestipendien,  
den Mitarbeitern des Instituts für Biochemie II für ihre freundliche Zusammenarbeit und  
Ina, Martina, Nora und Simon für kurzweilige Stunden während des experimentellen  
Teils der Arbeit im Labor.

Jena, den 16. Dezember 2003

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Klinger, Dr. Martin Schmidt,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 16. Dezember 2003

**Lebenslauf**

Name, Vorname:	Schödel, Johannes
Geburtsdatum:	03. Juli 1977
Geburtsort:	Marktrechwitz
Familienstand:	ledig
1983-1987:	Grundschule Kirchenlamitz
1987-1996:	Luisenburg-Gymnasium Wunsiedel
1997-2002:	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
02/2001-06/2001:	Studium der Humanmedizin an der Università di Padova, Italien
10/2002-10/2003:	Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg

Jena, den 16. Dezember 2003

## Eigene Publikationen

Teile dieser Arbeit sind bisher veröffentlicht:

J Schödel, R Klinger and M Schmidt. Extracellular nucleotides stimulate lipogenesis in rat adipocytes via a P2-receptor. Int. J. Obesity 25 (Suppl. 2) 2001, S34-S40  
(Kongressbeitrag)

J Schödel, I Weise und M Schmidt. Mindestens zwei P2-Rezeptoren sind an der Regulation der Lipogenese in Adipozyten beteiligt. Aktuel Ernaehr 26, 2001, 236  
(Kongressbeitrag)

J Schödel, I Weise und M Schmidt. Die Wirkung von P2-Rezeptor-Agonisten auf die Regulation von Lipogenese und Lipolyse in Adipozyten durch Insulin. Aktuel Ernaehr 27, 2002, 351  
(Kongressbeitrag)

J Schödel, I Weise, R Klinger, M Schmidt. Stimulation of lipogenesis in rat adipocytes by extracellular ATP, a ligand for P2-receptors. (Zur Veröffentlichung eingereicht)  
(Originalarbeit)